i

Universidade de São Paulo Instituto Oceanográfico Laboratório de Química Orgânica Marinha

Avaliação da biodisponibilidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) na Baía de Santos através de metabólitos biliares.

# Ana Cecília Rizzatti de Albergaria Barbosa

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência, Programa de Oceanografia Química e Geológica.

Julgada em \_\_\_\_/\_\_\_ por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Caruso Bícego Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP)

conceito

Prof(a). Dr(a).

conceito

Prof(a). Dr(a).

conceito

"...Quem ouve desde menino; Aprende a acreditar; Que o vento sopra o destino; Pelos caminhos do mar...." (Dorival Caymmi)

Dedico esta tese aos meus melhores amigos: meus pais!

# ÍNDICE

| LISTA DE FIGURAS viii   |
|---|
| LISTA DE TABELAS xi   |
| LISTA DE ABREVIAÇÕES xiii   |
| RESUMO xviii  |
| ABSTRACT xix  |
|   |
| 1. INTRODUÇÃO   |
| 1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs)                 |
| 1.1.1. Sistema de Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos (MFOs) em |
| peixes  |
| 1.1.2.Biomarcadores de exposição 24                                 |
| - Metabólitos biliares de PAHs 25                                   |
| - Proteínas biliares 26   |
| - Atividade da 7-etoxiresorufina-desetilase (EROD) 27               |
| 1.2. Baía de Santos (fontes de contaminação) 28                     |
|   |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   |
|   |

| 3. MATERIAIS E MÉTODOS                     | 33 |
|--|----|
| 3.1. Caracterização da área de estudo      | 33 |
| 3.2. Coleta dos organismos                 | 35 |
| 3.3. Caracterização das espécies estudadas | 37 |

| 3.3.1. Família Scianidae                                       | 38   |
|--|------|
| -Stellifer rastrifer (Cangoá)                                  | 39   |
| - Nebris microps (pescada banana)                              | . 40 |
| - Micropogonia furnieri (corvina)                              | 40   |
| 3.3.2. Família Tetraodontidae                                  | 42   |
| - Sphoeroides testudineus (baiacu)                             | 42   |
| 3.4. Análise de metabólitos de PAHs (varredura de metabólitos) | . 43 |
| 3.4.1. Método de análise dos metabólitos de PAHs (HPLC/F)      | 43   |
| 3.4.2. Controle Analítico para análise de metabólitos de PAHs  | 48   |
| 3.5. Análise de proteínas biliares totais                      | 49   |
| 3.5.1. Controle Analítico para análise de metabólitos de PAHs  | 50   |
| 3.6. Análise de enzimas  | 51   |
| 3.7. Amostra controle (BCC)                                    | 52   |

| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 55           |
|---|--------------|
| 4.1. Biodisponibilidade dos PAHs na Baía de Santos                        | 55           |
| 4.2. Variação Interespecífica, espacial e temporal dos metabo<br>biliares | ólitos<br>59 |
| 4.2.1. Variação entre as espécies estudadas                               | 59           |
| 4.2.2. Variação espacial  | 64           |
| 4.2.3. Variação temporal  | 68           |
| 4.3. Metabólitos de PAHs x proteínas biliares                             | 71           |
| 4.4. Variação da atividade EROD e dos níveis de metabólitos biliares      | nas          |
| espécies estudadas  | 76           |

| 5. CONCLUSÕES |  |
|---------------|--|
|               |  |
|               |  |

| IBLIOGRAFIA |
|-------------|
|-------------|

# LISTA DE FIGURAS

| Figura 1.1.: Esquema sobre os modos de assimilação de PAHs pelos peixes 22   |
|--|
| Figura 1.2.: Passos metabólicos da ativação do Benzo(a)pireno para sua posterior excreção (Fonte: www.inchem.org/documents/ehc/ehc/v202eh08.gif) 24  |
| Figura 1.3.: Localização geográfica da Baixada Santista (fonte: Governo do Estado de São Paulo, 2007) 29   |
| Figura 1.4.: Localização geográfica da Baía de Santos 29   |
| Figura 3.1.: Localização geográfica das áreas amostradas na Baía de Santos. Amostras<br>obtidas na área 1 serão denominadas como Região Oeste (RO), na área 2 serão<br>denominados como Região Central (RC) e na área 3, Região Leste (RL)                       |
| Figura 3.2.: Digrama de classificação científica das quatro espécies estudadas   |
| Figura 3.3.: Stellifer rastrifer (fonte: http://www.fishbase.org)  |
| Figura 3.4.: Nebris microps (fonte: http://www.fishbase.org)40   |
| Figura 3.5.: <i>Micropogonia furnieri</i> (fonte: http://www.fishbase.org)   |
| Figura 3.6.: Sphoeroides testudineus (fonte: http://www.fishbase.org)  |
| Figura 3.7.: Gradiente de solventes usado para separação dos compostos 44  |
| Figura 3.8.: Fluxo usado para separação dos compostos 45   |
| Figura 3.9.: Exemplo de varredura feita para verificação do comprimento de onda de emissão ótimo do BaP em 3D. Eixo x representa o tempo de retenção; eixo y, o comprimento de onda; e eixo z, sensibilidade   |
| Figura 3.10: Exemplo de gráfico de varredura gerado para otimização dos comprimentos de ondas de emissão de BaP em 2D. A escala vai de vermelho (mais sensível) a azul (menos sensível). O eixo x representa o comprimento de onda e o eixo y, tempo de retenção |

| Figura 3.11.: Fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares segundo<br>Fryer <i>et al.</i> (1986) (adaptado de Lowry <i>et al.</i> , 1951)   |
|--|
| Figura 3.7.: Fluxograma do método usado para análise da atividade EROD segundo<br>Hodson <i>et al.</i> (1991) 52   |
| Figura 4.1.: Gráficos do tipo Box-and-whisker plots obtidos para os MT, de NAF, FEN e<br>BaP (em μg.g <sup>-1</sup> de bile) encontrados nas amostras coletadas na Baía de Santos 56   |
| Figura 4.2.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em µg.g <sup>-1</sup><br>de bile) encontrados nas espécies <i>S. rastrifer</i> , <i>M. furnieri</i> , <i>N. microps</i> e <i>S. testudineus</i> coletadas na Baía de Santos |
| Figura 4.3.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de NAF (em µg.g <sup>-1</sup><br>de bile) encontrados nas espécies <i>S. rastrifer</i> , <i>M. furnieri</i> , <i>N. microps</i> e <i>S. testudineus</i> coletadas na Baía de Santos |
| Figura 4.4.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de FEN (em µg.g <sup>-1</sup><br>de bile) encontrados nas espécies <i>S. rastrifer</i> , <i>M. furnieri</i> , <i>N. microps</i> e <i>S. testudineus</i> coletadas na Baía de Santos |
| Figura 4.5.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de BaP (em μg.g <sup>-1</sup><br>de bile) encontrados nas espécies <i>S. rastrifer</i> , <i>M. furnieri</i> , <i>N. microps</i> e <i>S. testudineus</i> coletadas na Baía de Santos |
| Figura 4.6.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos totais (em µg.g <sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL   |
| Figura 4.7.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de NAF (em μg.g <sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL   |
| Figura 4.8.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de FEN (em μg.g <sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL   |
| Figura 4.9.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de BaP (em μg.g <sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL   |
| Figura 4.10.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos totais (em μg.g <sup>-1</sup> de bile) encontradas entre os meses de jun/jul/ago; set/out; nov/dez  |

#### LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.5.: Atividade EROD (em pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína) e Metabólitos de PAHs totais biliares (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) obtidos para *S. rastrifer, M. furnieri, N. microps* e

| S. testudineus | analisados     | em outubro | e novembro | de 2005. | R <sup>2</sup> = correlaçã | o de |
|----------------|----------------|------------|------------|----------|----------------------------|------|
| Spearman; p= n | ível de signif | ficância   |            |          |                            | 77   |

# LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Ah - Complexo Receptor Aril

ASMBC - Atlantic Salmon Monterey Bay Crude Oil

BaP - Benzo(a)pireno

BCC - Baiacu de Cananéia exposto ao óleo Carmópolis

BFC - Fator de bioacumulação

**ECOSAN** – Projeto temático "A influência do complexo estuarino da Baixada Santista sobre o ecossistema da plataforma continental adjacente" (PRONEX-CNPQ/FAPESP nº 03/09932-1)

EROD - 7-etoxiresorufina-desetilase

FEN - Fenantreno

GC/MS – cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa

HPLC/F – cromatógrafo a líquido de alto desempenho acoplado a detector de fluorescência

IOUSP – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

LabQOM – Laboratório de Química Orgânica Marinha

LD – Limite de detecção do método

LQ – Limite de Quantificação do método

met. BaP - metabólitos biliares equivalentes de benzo(a)pireno

met. FEN - metabólitos biliares equivalentes de fenantreno

met. NAF – metabólitos biliares equivalentes de naftaleno

**MFOs** – sistema de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (monooxigenases de função mista)

MT - metabólitos biliares toais

n – número de indivíduos amostrados

NAF - Naftaleno

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration

OH-PAHs - derivados hidroxilados dos PAHs

OT - rede de arrasto tipo Otther Trawl

P.A. – padrão analítico

PAHs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**PBDEs** – Bifenilos Polibromados

PCBs – Bifenilos Policlorados

- PT Proteínas biliares totais
- RC Região Central da Baía de Santos
- RL Região Leste da Baía de Santos
- RO Região Oeste da Baía de Santos

#### AGRADECIMENTOS:

Durante a realização deste trabalho tive o incentivo, a ajuda e a amizade de muitas pessoas que foram essenciais.

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre presente, me orientando a trilhar os melhores caminhos na minha vida. Muito Obrigada!

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Márcia Caruso Bícego, não apenas pela orientação neste trabalho, mas por toda confiança depositada em mim. Além disso, muito obrigada por toda amizade e apoio que me foram dados desde minha época de estágio, passando pela iniciação científica e chegando ao mestrado.

À Satie pela amizade e por ter <u>muita</u> paciência comigo. O que seria de mim sem você? Obrigada por toda ajuda! Ah... E obrigada também por trazer o Eric de vez em quando ao laboratório!

Ao Prof. Dr. Michel Michaelovitch de Mahiques, Presidente da Comissão de Pós-graduação, e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Rosalinda Carmela Montone, Coordenadora do Programa de Oceanografia Química e Geológica.

Ao Denis, pela confiança ao ter me indicado para trabalhar com metabólitos no LabQOM e por ter sido meu "tutor", desde as remotas épocas de graduação.

Agradeço ao Lourival, pelos conselhos, pela ajuda na hora de colocar a "mão na massa" e pela companhia nos trabalhos de campo das monitorias de graduação. Agradeço ao Prof. Dr. Rolf Roland Weber e ao Silvio pela amizade. Agradeço também à Verinha e ao João, meus companheiros da Pérola Negra.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes, ao Prof. Dr. Phan Van Ngan e à Zezé por terem me apoiado e cedido um espaço no Laboratório de Ecofisiologia, a fim de que eu pudesse dar prosseguimento nas análises de atividade EROD. Ao Fábio, à Maysa e à Thaís pela ajuda dada na realização destas análises. Ao Arthur, não só pelas ajudas com as análises da atividade EROD, mas também pelo apoio dado nas coletas dos Baiacus em Cananéia, e por ter sido um verdadeiro professor ao me ensinar tudo sobre metabolismo de peixes e ensaio cometa. Com certeza, sua ajuda foi indispensável! Ao Prof. Dr. Paulo Yukio e à equipe do Laboratório de Dinâmica Bêntica, por terem cedido espaço no ultrafreezer para armazenamento das amostras de fígado e bile.

À Profa. Dra. June Ferraz Dias e à equipe do Laboratório de Ecologia Reprodutiva e do Recrutamento, pela ajuda na identificação dos peixes coletados e na discussão dos resultados encontrados.

À profa. Dra. Glaucia Maria B. Ambrosano e ao prof. Dr. Rubens César Lopes Figueira pela ajuda com as análises estatísticas feitas durante o trabalho.

Aos tripulantes do N. Oc. Prof. Wladimir Besnard, e dos barcos de pesquisa Albacora e Velliger II, bem como aos funcionários da base Dr. João de Paiva Carvalho (Cananéia) e da base Clarimundo de Jesus (Ubatuba), pelos auxílios prestados na realização dos trabalhos de campo. Aos pesquisadores integrantes do Projeto Ecosan que me auxiliaram nas coletas. Aos funcionários da Biblioteca Prof. Dr. Gelso Vazzoler, em especial ao Wagner, pela revisão bibliográfica, e à Cida, pela ajuda nas buscas dos livros que eu queria. Às funcionárias da secretaria de pósgraduação do IO-USP e da secretaria do DOF por toda paciência que tiveram comigo. A todos os funcionários e alunos do IO-USP que contribuíram na realização deste trabalho.

Aos alunos da Turma VII, bem como às outras Turmas com as quais tive contato nas monitorias e nos campos da graduação. Aprendi muito com vocês!

Ao pessoal do cantinho da vadiagem do LabQOM, por serem excelentes amigos: Diego (amigo saltador inseparável), Hileia (também conhecida como Hylary), Josi (Cleidinha delicadinha da motoquinha), Fernanda (que tirava todas as minhas dúvidas de biologia),, Edgar (que me dava bombom de cupuaçu), Vinícius (Vivi, meu amigo corredor e de bile), Caio Vinícius (Caca Vivi), Caio Augusto (Caca Auau), Eliete (sempre tirando minhas duvidas), Mauro (eterno amigo de <u>Perna</u> <u>perna</u>), Patrick(também conhecido como Patrick), Felipe (Bino ou Cebolinha) e Renato (o tio do cafezinho). Não poderia esquecer a Sandrinha, o Vito, o Filipe, a Taís (os agregados mais queridos) e ao pessoal da "velha guarda": Mariana (mais nova carioca), Ju (que pacientemente me ensinou estatística à distância) e, claro, ao César e ao Rafael (pelos "conselhos" de vida). Agradeço também aos queridos estagiários: Dalton, Gabi, Renato, Olavo "Azeite", Pâmela, Marcelo "Escadinha", Ronaldo "Cascão", Roberto "Uberaba", Juliana e Lucas "Barbie".

E o que seria de mim sem a paciência e o carinho da minha família paulistana? Agradeço a Lilian, a Marcinha, a Louise e o Juliano por todos os momentos de descontração e por terem me ouvido todas as vezes que eu precisei. Agradecimentos especiais ao meu grande amigo Enzo, meu meteorologista predileto, que além de ter sido paciente comigo, gastou seu "precioso tempo" me ajudando a ver as condições meteorológicas da Baixada Santista durante minhas coletas. Também queria agradecer aos meus grandes amigos que, mesmo à distância, foram e são muito importantes para mim: Bruna, Gulão, Débora, Nico, Juliana, Karina (*in memorian*), Guilherme e toda galera da Sesmarias.

Agradecimentos especiais aos meus pais, José Ricardo e Célia: os melhores amigos que alguém pode ter. Agradeço por todo carinho e incentivo. Vocês me serviram como exemplo em todos os momentos da minha vida, sendo meu ponto de apoio sempre. Amo demais vocês! Sem dúvida, são pessoas muito importantes para mim. A realização deste mestrado não teria sido possível se vocês não me apoiassem! Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, deixo aqui registrado os meus agradecimentos. Muito obrigada!

Ambientes marinhos adjacentes a centros urbanos, como a Baía de Santos, estão sujeitos à introdução de contaminantes que apresentam caráter tóxico, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). A biodisponibilidade dos PAHs pode ser avaliada através de biomarcadores de exposição, como metabólitos biliares e atividade da 7-etoxiresorufina-desetilase (EROD). Este trabalho investigou a biodisponibilidade dos PAHs na Baía de Santos através dos metabólitos biliares, usando a atividade EROD como análise auxiliar. Coletas mensais foram realizadas em três regiões da Baía de Santos entre junho e dezembro de 2005. As espécies escolhidas foram: Stellifer rastrifer, Micropogonia furnieri, Nebris microps e Sphoeroides testudineus. Os metabólitos foram analisados através de cromatógrafo a líquido com detector de fluorescência (HPLC/F). A concentração de metabólitos biliares e de atividade EROD variou, respectivamente de 65,5 a 589 µg.g<sup>-1</sup> de bile e 6,88 a 262 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína. Os níveis de metabólitos de fenantreno e benzo(a)pireno foram menores na espécie N. microps e maiores na S. testudineus, não havendo diferenças significativas entre as espécies para os metabólitos de naftaleno. Não houve diferenças significativas dos metabólitos estudados entre os locais e períodos de coleta. A biodisponibilidade de PAHs na Baía de Santos foi evidenciada pelos metabólitos e confirmada pela atividade EROD.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, Baía de Santos, biodisponibilidade, biomarcadores de exposição, metabólitos biliares, HPLC/F.

#### ABSTRACT

Marine environments near urban areas, such as Santos Bay, are subjected to toxic contaminants input, as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The PAHs bioavailability can be evaluated through biomarkers, such as biliary metabolites and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD). The goal of the present study was to evaluate the PAH bioavailability in Santos Bay through the biliary metabolites, and the EROD activity as an auxiliary analysis. The samples were collected in three different regions of Santos Bay. The chosen species were: Stellifer rastrifer, Micropogonia furnieri, Nebris microps e Sphoeroides testudineus. The metabolites were analyzed through a high performance liquid chromatograph with fluorescence detector (HPLC/F). The metabolites and the EROD activity concentration varied, respectively, from 65,5 to 589  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> of bile and 6,88 a 262 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> of protein. The phenanthrene and benzo(a)pirene metabolites levels were lower to N. microps and higher to S. testudineus. The naphthalene metabolites did not present significant differences among the species. There were no significant differences in the metabolites for the sampling areas and the period of collection. The PAHs bioavailability was evidenced by the metabolites and confirmed through the EROD activity.

**Keywords:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Santos Bay, bioavailability, biomarkers, biliary metabolites, HPLC/F.

#### 1. INTRODUÇÃO

As águas costeiras estão sujeitas a introdução de compostos antropogênicos devido a presença de comunidades urbanas e centros industriais ao longo de áreas litorâneas (van der Oost *et al.*, 2003; Shalaija *et al.*, 2006). Ambientes marinhos adjacentes a centros urbanos, como o caso da Baía de Santos, são depósitos freqüentes de diversos contaminantes (Benoliel, 1986; Clark, 1997; Bajpai *et al.*, 2002; Magalhães, 2005; Martins, 2005), como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (Medeiros & Bícego, 2004a; Albergaria-Barbosa, 2006). Os PAHs são compostos principalmente introduzidos por petróleo ou queima de combustíveis fósseis, cujo caráter tóxico, faz com que sejam alvo constante de estudos de qualidade ambiental (Bainy, 1993; Baumard *et al.*, 1998, 1999; Francioni *et al.*, 2007; Johson-Restrepo *et al.*, 2008).

### 1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs)

Os PAHs pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos formados por dois ou mais anéis benzênicos condensados. O principal interesse em se estudar esta classe de compostos está relacionado à sua potencial toxicidade (International Agency For Research In Cancer, 1983; National Research Council – United States, 1985; Larsen, 1995; Giessing *et al.*, 2003), já que, uma vez biodisponíveis, podem apresentar caráter mutagênico e carcinogênico, trazendo riscos aos organismos marinhos que habitam as áreas contaminadas (Smith *et al.*, 1994; Baumann & Harshbarger, 1998; Johnson *et al.*, 1998).

O caráter apolar das ligações atômicas dos PAHs faz com que estes apresentem baixa solubilidade na água e elevados coeficientes de partição octanol/água (Kow) (Neff, 1979; Eisler, 1987; Baumard *et al.*, 1998). Dessa forma, quando lançados no ambiente marinho estes compostos se associam com as partículas em suspensão, depositando e acumulando nos sedimentos (Gearing *et al.*, 1980; Law & Biscaya, 1994; Fernández *et al.*, 1997).

Os principais meios de introdução de PAHs no ambiente marinho são, como dito anteriormente, antrópicos através dos processos de pirólise e a queima parcial de combustíveis fósseis, derrames acidentais ou crônicos de petróleo e derivados, e pelo descarte de efluentes industriais e domésticos (Colombo *et al.*, 1989; Law & Biscaya, 1994). Outras possíveis fontes são: queimadas de florestas, transporte de material de áreas continentais por rios e diagênese de matéria orgânica no sedimento (McElroy *et al.*, 1993). Para avaliar a distribuição no ambiente e a principal fonte de PAHs, usa-se sedimento como matriz de análise, já que este é o principal depósito desta classe de compostos (Bouloubassi & Saliot, 1993; Law & Biscaya, 1994; Wang & Fingas, 1997; Wang *et al.*, 1999; Medeiros & Bícego, 2004a,b). Entretanto, essa análise não avalia a biodisponibilidade destes contaminantes à biota presente no ambiente marinho.

Os monitoramentos feitos através dos efeitos biológicos ocasionados pela exposição dos organismos aos contaminantes vêm sendo reconhecidos por programas e comitês do mundo todo (UNEP/IOC/IAEA/FAO, 1989; International Council For The Exploration Of The Sea, 2007). Organismos marinhos são freqüentemente usados nas análises de contaminação por PAHs (Yu *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1997; Baumard *et al.*, 1998; Baumard *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2006). Os peixes são tidos como boas matrizes (Power, 1989) uma vez que são encontrados em quase todos os ambientes aquáticos; o entendimento da toxicologia, do comportamento e da resposta dos contaminantes nestes organismos tem alta relevância ecológica; e eles exercem um importante papel na cadeia alimentar, interligando níveis tróficos mais baixos com mais altos (Stegeman *et al.*, 1994; van der Oost *et al.*, 2003).

Os peixes, a partir do momento que estão em contato com os PAHs, assimilam parte dos compostos expostos através de alimentos já contaminados, pela filtração das brânquias ou ainda pela absorção dérmica (Figura 1.1.) (Bailey *et al.*, 1989).



Figura 1.1.: Esquema sobre os modos de assimilação de PAHs pelos peixes.

A exposição de organismos aos PAHs costuma ser avaliada através de tecidos, porém, peixes capturados em locais muito poluídos geralmente mostram níveis traço, nem sempre refletindo a exposição ambiental a qual foram submetidos (Varanasi et al., 1989). Análises feitas em peixes coletados em áreas impactadas por óleo, por exemplo, mostraram a presença de hidrocarbonetos aromáticos com 2 a 3 anéis benzênico, como o naftaleno (NAF) e o fenantreno (FEN), porém encontrou-se poucos com 4 a 6 anéis, como o benzo(a)pireno (BaP), que apresenta uma característica carcinogênica e teratogênica (Baumann et al., 1982; Black, 1983; Varanasi et al., 1989). Meador et al. (2006) expuseram peixes juvenis a doses de PAHs que variaram de 0.7 a 22 µg.g<sup>-1</sup> de tecido por dia e observou que as concentrações encontradas nos tecidos variaram de 0,07 a 2,3 µg.g<sup>-1</sup> de tecido, indicando uma perda de mais de 90% dos PAHs ingeridos. Balk et al. (1986) e Stein et al., (1987), ao estudarem a distribuição de BaP em diferentes tecidos e fluídos de Esox lucius e Paraphrys vetulus, observaram que as maiores concentrações estavam no sistema hepato-biliar destes animais e as menores concentração, nos tecidos extra-hepáticos. Este fato é devido à habilidade de metabolização dos PAHs pelo fígado de vertebrados como peixes, aves e mamíferos (Stegeman & Lech, 1991), gerando baixa acumulação destes compostos nos tecidos.

# 1.1.1. Sistema de Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos (MFOs) em peixes

Tem-se comprovado que vertebrados como peixes, aves e mamíferos possuem um sistema de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (monooxigenases de função mista - MFOs) no sistema hepático altamente desenvolvido (Inzunza *et al.*, 2006). Estas apresentam um papel importante na biotransformação de poluentes orgânicos (Den Besten *et al.*, 1990), sendo capazes de transformar compostos mais apolares, como os PAHs, bifenilos policlorados (PCBs), difenis éter polibromados (PBDEs) e dioxinas, em produtos hidrofílicos, facilitando sua excreção (Collier & Varanasi, 1991; Britvic *et al.*, 1993; Upshall *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1995; Gewurtz *et al.*, 2000).

Em peixes, acredita-se que a atividade catalítica dos PAHs está vinculada a um único citocromo dentro do sistema P450 (CYP), denominado CYP1A1 (Stegeman & Lech, 1991). O mecanismo de indução ocorre através da afinidade do complexo receptor aril (Ah), presente nas enzimas do citocromo, aos compostos aromáticos planares.

A metabolização dos PAHs ocorre em duas fases. Na Fase I, os PAHs são oxidados pelas enzimas pertencentes às MFOs, seguido pela redução ou hidrólise, formando derivados hidroxilados (OH-PAHs) (Hodson *et al.*, 1998). Na Fase II da via metabólica, os OH-PAHs são conjugados pelo mesmo grupo de enzimas, gerando epóxidos, dihidrodióis e diol-epóxidos, a fim de formar compostos mais solúveis na água, sendo incorporados na bile, onde finalmente são depositados na vesícula biliar para eliminação pelo organismo (Bauhler & William, 1989; Foureman, 1989).

A toxicidade relacionada aos PAHs não está ligada aos compostos em si, já que estes não são carcinogênicos ativos. Durante o processo de metabolização dos PAHs há a produção de compostos intermediários altamente reativos que podem combinar com proteínas e ácidos nucléicos, conduzindo em mutagênese e carcinogênese (Fent & Bätscher, 1999). Os metabólitos formados pelo processo de desintoxicação dos PAHs também podem se associar aos substratos hidrossolúveis endogênicos dos organismos, como sulfatos conjugados, glutationa, glucuronida, aminoácidos, DNA ou RNA, gerando problemas fisiológicos e ocasionando tumores (Levin *et al.*, 1978; Hinton *et al.*, 1992). Metabólitos de PAHs encontrados em peixes bentônicos

têm alta correlação com lesões hepáticas no fígado (Krahn *et al.*, 1986; Baumann & Harshbager, 1995; Inzuna *et al.*, 2006).

A Figura 1.2., como exemplo, é um diagrama da ativação do BaP pelo citocromo P-450. Neste caso, a oxidação seqüencial e os passos catalíticos de hidratação formam estruturas dihidrodiois-epóxido, que são as estruturas derivadas do BaP conhecidas por serem tóxicas (Stegeman & Lech, 1991).



Figura 1.2.: Passos metabólicos da ativação do benzo(a)pireno para sua posterior excreção (Fonte: www.inchem.org/documents/ehc/ehc/v202eh08.gif)

#### 1.1.2. Biomarcadores de exposição

Como o fator de bioacumulação dos PAHs em tecidos de peixes é baixo, há a necessidade do uso de outros biomarcadores para avaliar a biodisponibilidade desta classe de compostos (Varanasi *et al.*,1989).

Biomarcadores são produtos de biotransformação/alterações bioquímicas, cuja determinação em fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado avaliam a exposição de um organismo a um determinado agente químico (World Health Organization, 1996; Amorim, 2003). Para a validação de um biomarcador, é necessário que este tenha determinadas características físicoquímicas importantes à sua função, como: refletir a interação do xenobiótico com o organismo; ser sensível e específico em relação a esta interação; ser reprodutível; estar presente num meio biológico cuja análise seja acessível e apresentar exatidão e precisão adequadas (World Health Organization, 1993).

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, inclusive em monitoramentos ambientais (Amorim, 2003). O Comitê de Marcadores Biológicos do Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos, em 1987, classificou os biomarcadores em 3 tipos, segundo o seu uso principal (Rodrigues, 2003):

- Biomarcadores de efeito: usados para documentar alterações/efeitos adversos na saúde dos organismos estudados decorrentes da exposição e absorção de substâncias químicas endógenas a estes (Amorim, 2003);
- Biomarcadores de susceptibilidade: servem como indicadores da sensibilidade de um sistema à exposição de um composto xenobiótico (Amorim, 2003; Rodrigues, 2003);
- Biomarcadores de exposição: usados para avaliar a exposição de um indivíduo ou de um grupo a um contaminante, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (Amorim, 2003).

Vários trabalhos identificaram diversos tipos de biomarcadores que podem ser usados como indicadores de exposição a contaminantes, incluindo os PAHs. Entre esses incluem análise dos adutos de DNA, ensaio cometa, a indução das MFOs através da análise da atividade da 7-etoxiresorufinadesetilase, e a quantificação dos metabólitos de PAHs fluorescentes na bile (van der Oost *et al.*, 2003). No presente trabalho, foram usados os dois últimos citados. Estes são considerados excelentes biomarcadores de exposição recente aos PAHs, (Krahn *et al.*, 1984; Lin *et al*, 2001; Lee & Anderson, 2005), pois diminuem algumas semanas após a não exposição do indivíduo ao composto (Collier *et al*, 1996; Hugget *et al.*, 2003, Lee & Anderson, 2005).

#### - Metabólitos biliares de PAHs

Estudos de laboratório demonstraram que a presença dos metabólitos biliares de PAHs é bem correlacionada com os níveis de exposição dos peixes

a estes compostos (van der Oost *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1995), fazendo com que muitos trabalhos usem esta análise para avaliar a contaminação de uma região (Krahn *et al.*, 1984; Collier & Varanasi, 1991; Britivic *et al.*, 1993; Inzunza *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Johnson-Restrepo *et al.*, 2008; Meador *et al.*, 2008).

Muitos estudos descrevem a análise dos metabólitos de PAHs em peixes através de determinações cromatográficas ou através de métodos de espectrometria. O sistema de cromatografia a líquido de alto desempenho acoplado a detectores de fluorescência (HPLC/F) tem-se mostrado uma técnica muito satisfatória para quantificação de metabólitos de PAHs na bile (Krahn et al. 1984, 1986, 1987; Ariese et al., 1993; Beyer et al., 1996, Eggens et al., 1996, Lin et al, 1996; Aas et al., 1998; Escartin & Porte, 1999a,b,c; Stroomberg et al., 1999; Ruddock et al., 2002).

Para validação deste método, Krahn *et al.* (1992, 1993) o comparou com a análise em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS), que quantifica os metabólitos individualmente. Correlações significativas foram obtidas para ambas as técnicas, demonstrando que o HPLC/F pode ser usado para análise de metabólitos de PAHs em bile, sendo uma técnica mais rápida, simples e de custo relativo baixo.

A concentração de metabólitos analisados através do HPLC/F é normalmente feita através da quantificação de três grupos principais (NAF, FEN e BaP), correspondentes geralmente as três classes gerais: de baixo, médio e alto peso molecular (Krahn *et al.*, 1986). Este método não permite separar cada um dos metabólitos individuais provenientes de cada PAH original, sendo uma técnica semi-quantitativa que fornece uma estimativa dos níveis de metabólitos de PAHs. Portanto, os resultados são interpretados como metabólitos equivalentes aos comprimentos de onda (excitação/emissão) de cada PAH original por grama de bile.

#### - Proteínas biliares

A quantidade de metabólitos na bile pode ser influenciada por fatores externos e fisiológicos, como volume da vesícula biliar. As moléculas de PAHs entram nos peixes por diversas rotas, indo parar na circulação sanguínea, sendo, na sua maioria, metabolizadas no fígado e excretadas pela vesícula biliar através de um duto hepato-biliar que o conecta ao intestino. Quando o peixe se alimenta, a bile é lançada no intestino, fazendo com que diminua o volume da vesícula biliar, aumentando a concentração de metabólitos de PAHs durante este período (Richardson *et al.*, 2004)

No geral, baixos volumes de bile estão associados aos animais que foram recém alimentados, e altos volumes, aos animais em jejum. A influência das diferentes condições alimentares na concentração de metabólitos de PAHs é muito pouco conhecida (Beyer *et al.*, 1997; Brumley *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2004). Dessa forma, há a necessidade de serem feitas normalizações nas concentrações de metabólitos, através de compostos associados à bile que também variem com o volume, como as proteínas biliares totais e/ou pigmentos biliares (Richardson *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006, Vuorinen *et al.*, 2006). Estas análises podem ser facilmente processadas através de um espectrofotômetro com multi-leitor de micro-placas, sendo também uma técnica simples, rápida e de baixo custo relativo (Lowry *et al.*, 1951).

#### - Atividade da 7-etoxiresorufina-desetilase (EROD)

O sistema do citocromo P-450 é um promissor biomarcador de exposição, sendo muito usado em programas de monitoramento ambiental (Payne, 1984). A atividade deste sistema nos peixes, para os PAHs, é tradicionalmente acessada através de sua razão catalítica que é facilmente analisada através da atividade da 7-etoxiresorufina-desetilase (EROD) (Richardson *et al*, 2001). A atividade EROD é tão crucial no metabolismo dos PAHs que fatores que afetam seu desempenho afetam também a concentração de seus metabólitos na bile (Van Veld *et al.*, 1990; Addison *et al.*, 1994; Stegeman & Hahn, 1994; Whyte *et al.*, 2000). Muitos trabalhos demonstraram que peixes coletados em regiões contaminadas por PAHs apresentaram um aumento na atividade EROD (Collier *et al.*, 1996; Kirby *et al.*, 1999) e que a atividade catalítica aumenta proporcionalmente à exposição do organismo aos xenobióticos (Mix, 1986; van der Oost et al., 2003).

A indução das MFOs é muito sensitiva e seletiva para compostos indutores do tipo PAH. Infelizmente, informações relacionadas à significância fisiológica e toxicológica desta indução são muito limitadas (Förlin *et al.*, 1985).

#### 1.2. Baía de Santos (fontes de contaminação)

A Baixada Santista (Figura 1.3.), região onde está contida a Baía de Santos (Figura 1.4.), é um dos mais antigos núcleos urbanos do Brasil, sendo historicamente ocupada de maneira desorganizada (Abessa, 2002). A partir da década de 50, fatores como a proximidade com a cidade de São Paulo, a construção de uma rodovia, ferrovia e de um porto bem desenvolvido, a disponibilidade de água e a presença de uma usina geradora de energia (Usina de Henry Borden), geraram na região a implantação de indústrias, ocasionando um aumento da densidade populacional (CETESB, 2001). A cidade de Santos, em 2001, contava com uma população de 412.375 habitantes, e a cidade de São Vicente, com uma população de 329.370 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008), totalizando aproximadamente 741.745 habitantes na região da Baía de Santos.

O sistema de disposição oceânica de esgotos de Santos/São Vicente é uma importante fonte de contaminação. Além da descarga de efluentes industriais e daqueles decorrentes das atividades portuárias, há também o lançamento de esgoto através de sistemas de emissários e ou através lançamento de dejetos *"in-natura"* provenientes principalmente de bairros suburbanos e favelas (Abessa, 2002; Fukomoto, 2007). Além disso, a região comporta o núcleo industrial mais importante do país, o complexo de Cubatão, que contém mais que 1.100 indústrias incluindo petroquímicas, siderúrgicas e produtores de fertilizantes, descarregando no estuário cerca de 100.000 kg.mês<sup>-1</sup> de vários poluentes tais como metais e produtos petroquímicos (CETESB, 2001). A implantação deste complexo industrial fez do Sistema Estuarino Santos/São Vicente um grande receptor de resíduos tóxicos e efluentes contaminados. Hoje, esta área representa um dos maiores exemplos de degradação ambiental no país (Tommasi, 1979; CETESB, 2001).



Figura 1.3.: Localização geográfica da Baixada Santista (fonte: <u>http://www.igc.sp.gov.br/mapras\_bsantista.htm</u>).



Figura 1.4.: Localização geográfica da Baía de Santos

Os lixões e aterros sanitários presentes na Baixada Santista são outras fontes importantes de contaminação (CETESB; 2001). O Lixão do Alemoa, por exemplo, desde a década de 70, foi local de disposição de resíduos sólidos domésticos. Apesar de, em 2002, haver uma decisão judicial proibindo seu uso para descarte de lixo, essa atividade foi interrompida somente em 2003 (Martins, 2005). Segundo a CETESB (2001), os aterros sanitários e os lixões são considerados fontes de alto risco, contribuindo para a contaminação do sistema estuarino.

O Porto de Santos, outra importante fonte de contaminação da região, é o mais importante do Brasil em termos de volume de carga (Seaports of South América, 1999). Com acessos rodoviários e ferroviários importantes, este permite o escoamento da produção agrícola e industrial do Estado de São Paulo e de outros centros produtores das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil e de países do Mercosul. Com 7,8 milhões de m<sup>2</sup>, cerca de 13 km de cais e o maior terminal de contêineres da América Latina, o Porto de Santos desempenha papel de agente de desenvolvimento regional e elo de diversas cadeias produtivas. No início de 2008, passaram por este porto 5.377.952 t de produtos através de 963 embarcações (485 eram navios) (Mensário Estatístico, 2008a,b). As atividades portuárias promovem o lançamento de petróleo e seus derivados na água, bem como de substâncias decorrentes de tintas antiincrustantes, perdas durante operações de carga e descarga e também pelo lixo e esgotos das docas e dos navios. Além disso, para permitir o tráfego de navios de grande porte, é feito no canal dragagens contínuas dos sedimentos, visando manter a profundidade adequada para as atividades portuárias (12 metros de profundidade em um canal de 5,2 km de comprimento por 100 m de largura). A dragagem e a disposição do material dragado, embora estritamente necessárias, são altamente impactantes (Abessa, 2002; Fukomoto, 2007; São Paulo, 2007). Antigamente, o sedimento era disposto de maneira irregular no Dique do Fradinho, na região da Ilha da Moela e na Ponta da Barra. Hoje, o sedimento é lançado na região oceânica, próximo a Ilha da Moela (Matos, 2002).

De uma maneira geral, a poluição existente nos ecossistemas locais e a falta de tecnologia para o controle das emissões e das fontes poluidoras foram responsáveis pela crise ambiental existente na Baía de Santos (Abessa, 2002). Hoje, sabe-se que a região recebe introdução de compostos contaminantes (Medeiros & Bícego, 2004a; Magalhães, 2005; Martins, 2005; Albergaria-Barbosa, 2006).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é:

• Investigar a biodisponibilidade de PAHs na Baía de Santos através da análise de metabólitos de PAHs biliares nas espécies *Stellifer rastrifer*, *Micropogonia furnieri*, *Nebris microps* e *Sphoeroides testudineus*.

Os seguintes objetivos específicos são propostos:

• Implantar e desenvolver o método para análise de metabólitos de PAHs em bile de peixes;

• Avaliar a diferença nas concentrações de metabólitos de PAHs em amostras de bile das espécies investigadas;

• Estimar a atividade EROD (atividade enzimática) nos fígados coletados das mesmas espécies e comparar com os resultados de metabólitos biliares.

# **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1. Caracterização da área de estudo

A Baixada Santista está localizada na porção central do litoral do Estado de São Paulo, entre as escarpas da Serra do Mar e o Oceano Atlântico (Abessa, 2002). No contexto geológico regional, esta região é limitada pela Falha de Cubatão a oeste e pela Falha de Santos a leste, compondo-se de rochas do Complexo Costeiro e da Suíte Granítica Indiferenciada (Fukumoto, 2003).

A Baía de Santos é um compartimento de ligação entre o complexo estuarino e a região costeira adjacente à Baixada Santista (Empresa de Portos do Brasil, 1977; Ribeiro-Neto, 1989), sendo delimitada pelas Pontas de Itaipú, em São Vicente, e da Monduba, no Guarujá. Entre a baía e o continente, na extremidade oriental da baixada Santista, localiza-se a Ilha de São Vicente, que é separada do continente por uma extensa zona de mangue. Sua posição faz com que ela se torne um grande tampão, dificultando o escoamento das águas continentais que vertem da serra e dos maciços litorâneos. Este compartimento, relativamente abrigado, recebe as contribuições dos canais de Santos e São Vicente, constituindo-se numa zona de mistura da água do mar com as águas salobras provenientes dos estuários (Magalhães, 2005).

A Baía de Santos, por se tratar de um ambiente costeiro aberto ao mar, constitui-se em um compartimento de troca entre águas oceânicas e estuarinas (Moser, 2002), apresentando uma intensa estratificação. Nos extratos inferiores a 2 m de profundidade, encontra-se, em cerca de 80% do tempo, águas provindas do oceano enquanto que, até 2 m de profundidade, as águas encontradas são provindas da descarga continental. Esta estratificação só é quebrada quando ocorre passagem de frentes frias, dando lugar a uma coluna de água mais homogênea (Occhipinti, 1972, 1975; Marcellino, 2000).

A maré na Baía de Santos é irregular, com ondas de caráter misto e semidiurnos que se propagam simultaneamente pelos canais de Santos e São Vicente e pelo Canal de Bertioga. Elas possuem um período médio de 12,4 horas, de modo que as amplitudes médias variam entre 27 cm na quadratura, e 123 cm na sizígia, no Porto de Santos. As máximas flutuações podem alcançar

cerca de 3,0 m em 2 a 4 dias, sendo produzidas por efeito simultâneo de marés meteorológicas e astronômicas (Harari *et al.*, 1990; Marcellino, 2000).

A circulação no interior da Baía é denominada pelas correntes de maré. Na enchente, a água oceânica penetra pela camada profunda, com direção e sentido constante, invadindo o estuário. A circulação superficial apresenta duas correntes entrando na baía, a leste e a oeste, e uma corrente principal de saída vinda do centro. Na vazante, uma corrente oriunda do Estuário de Santos sai margeando as praias, e se junta com a corrente de saída do Estuário de São Vicente, atingindo então a Baía de Santos pelo setor oeste. A leste, forma-se um campo de correntes de sentido oposto, dirigindo-se para o centro da baía, a partir dos costões rochosos da Ponta Grossa e da Ilha de Palmas (Empresa de Portos do Brasil, 1977). As correntes, em média, alcançam 40 cm.s<sup>-1</sup>, podendo aumentar, em superfície, para 60 cm.s<sup>-1</sup> à medida que se aproxima da praia (Marcellino, 2000).

As correntes que vão pela costa oeste na fase da vazante geram um ambiente de deposição de maior energia e estão associadas aos fundos de areia muito fina e bem selecionada, com predominância de feldspato. Já as correntes que penetram na Baía pelo lado leste geram um ambiente de deposição de baixa energia, associando-se aos fundos de silte mal selecionados e à presença de detritos vegetais de origem continental. Assim, conforme a composição e distribuição dos sedimentos na Baía de Santos, esta pode dividir-se em setor oeste, que sofre influência marinha e predominam sedimentos arenosos; e setor leste, que sofre influência do Canal do Porto e predominam sedimentos finos (Fúlfaro & Ponçano, 1976; Tommasi, 1979). Estes dois ambientes de deposição apresentam características ecológicas distintas. Tommasi (1979) observou que havia uma maior diversidade e abundância bentônica no setor leste da Baía, onde há sedimentos mais redutores e com maiores concentrações de sulfetos e carbono orgânico. Além disso, a drenagem continental carreia para a Baía grandes concentrações de nutrientes dando-lhe características acentuadamente eutrófica. As condições ecológicas do complexo baía-estuário da Baixada Santista estão intimamente associadas às características da região e à degradação ambiental causada pela atividade antrópica (Ribeiro-Neto, 1989).

#### 3.2. Coleta dos organismos

As coletas foram realizadas mensalmente entre junho e dezembro de 2005, na Baía de Santos. Estas foram feitas através de uma rede de arrasto de portas por 10 minutos em 6 pontos diferentes com auxílio do barco de pesquisa Velliger II da Universidade de São Paulo. Devido as dificuldade de amostragem e a fim de comparar as diferenças espaciais e mensais, estes 6 pontos foram agrupados, dividindo a baía em três áreas: uma central e duas laterais (Figura 3.1.).



Figura 3.1.: Localização geográfica das áreas amostradas na Baía de Santos. Amostras obtidas na área 1 serão denominadas como Região Oeste (RO), na área 2 serão denominados como Região Central (RC) e na área 3, Região Leste (RL).

Não foi possível obter todas as espécies avaliadas em todos os meses e áreas estudados, já que nem sempre estas se encontravam disponíveis. Não houveram replicatas devido ao pequeno volume de bile e ao número reduzido de indivíduos coletados. Foi necessário agrupar na mesma amostra organismos de diferentes sexos, estágios de maturação e tamanhos, até que o volume de bile coletado completasse 20µL aproximadamente. Os únicos critérios de separação que puderam ser adotados foram: espécie, área e mês de amostragem.

A seleção das espécies alvo foi feita de acordo com a ocorrência espacial e temporal destas. A ênfase foi dada para indivíduos demersais, por estes apresentarem contato com o sedimento acumulado no fundo. As espécies escolhidas foram: *Stellifer rastrifer, Nebris microps, Sphoeroides testudineus* e *Micropogonia furnieri*.

Os indivíduos coletados foram mantidos vivos até o momento da identificação das espécies e a tomada dos dados biométricos (Tabela 3.1.). Imediatamente após o sacrifício, a vesícula biliar foi retirada e, através de uma pequena incisão, a bile foi coletada em frascos criogênicos de 500µL.

A análise da atividade EROD foi feita nos organismos coletados em outubro e novembro. Para isto, anteriormente à coleta da bile, aproximadamente 1 g de fígado de cada indivíduo foi amostrado, sendo este armazenado individualmente em frascos criogênicos.

Tanto as amostras de bile quanto as de fígado foram, logo após a coleta, armazenadas em nitrogênio líquido, sendo levadas ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP), onde foram armazenadas em um freezer a -80°C.
|          | Ároa | Fsnécie                 |    | Compr. (mm) |           | Peso (g) |        |
|----------|------|-------------------------|----|-------------|-----------|----------|--------|
|          | Alea | Especie                 | IN | Média       | Desvio    | Média    | Desvio |
| iunho    | RO   | Stellifer rastrifer     | 12 | 139         | 15        | 29,6     | 12,3   |
| junno    | RC   | Stellifer rastrifer     | 6  | 159         | 11        | 55,9     | 13,7   |
| julho    | RC   | Micropogonia furnieri   | 2  | 238         | -         | 135      | -      |
| agosto   | RC   | Nebris microps          | 4  | 246         | 23        | 130      | 27     |
|          | RC   | Stellifer rastrifer     |    | 188         | 10        | 91,8     | 14,8   |
|          | RO   | Micropogonia furnieri   | 5  | 234         | 20        | 133      | 40     |
| setembro | RC   | Stellifer rastrifer     | 8  | 182         | 1         | 78,1     | 1,6    |
|          | RC   | Micropogonia furnieri   | 5  | 213         | 21        | 91,2     | 28,4   |
|          | RO   | Micropogonia furnieri   | 6  | 226         | 16        | 10       | 26     |
|          | RO   | Stellifer rastrifer     |    | 173         | 15        | 58,2     | 8,8    |
| outubro  | RC   | Nebris microps          |    | 288         | 11        | 241      | 36     |
|          | RC   | Micropogonia furnieri   | 4  | 222         | 15        | 13,0     | 10,5   |
|          | RL   | Stellifer rastrifer     | 4  | 159         | 11        | 51,1     | 9,3    |
|          | RO   | Stellifer rastrifer     | 3  | 177         | 8         | 72,2     | 14,6   |
|          | RO   | Sphoeroides testudineus | 1  | 220         | -         | 235      | -      |
|          | RO   | Sphoeroides testudineus | 1  | 222         | -         | 185      | -      |
|          | RC   | Nebris microps          | 6  | 207         | 7         | 207      | 4      |
|          | RC   | Sphoeroides testudineus |    | 187         | -         | 133      | -      |
| novembro | RC   | Sphoeroides testudineus | 1  | 138         | -         | 55,8     | -      |
|          | RC   | Micropogonia furnieri   |    | 241         | 14        | 141      | 26     |
|          | RL   | Sphoeroides testudineus |    | 160         | -         | 80,7     | -      |
|          | RL   | Sphoeroides testudineus |    | 176         | -         | 1230     | -      |
|          | RL   | Nebris microps          | 2  | 229         | -         | 119      | -      |
|          | RL   | Stellifer rastrifer     | 3  | 197         | 2         | 120      | 10     |
| dezembro | RC   | Micropogonia furnieri   | 3  | 257         | 11 137 23 | 23       |        |
| Gezembio | RL   | Sphoeroides testudineus | 1  | 221         | -         | 107      | -      |

Tabela 3.1. Dados biológicos dos peixes coletados na Baía de Santos durante os meses de junho a dezembro de 2005 (compr. = comprimento total, RO=região oeste da baía, RC=região central da baía, RL=região leste da baía).

### 3.3. Caracterização das espécies estudadas

A seleção das espécies usadas para elaboração do trabalho foi feita de acordo com a sua ocorrência espacial e temporal com ênfase para os indivíduos demersais, sendo todos Actinopterygii teleósteos. Três espécies são representantes da ordem dos Perciformes, família dos Sciaenidaes e uma espécie, da ordem dos Tetraodontiformes, família dos Tetraodontidaes. A Figura 3.2. mostra um resumo da chave classificatória das quatro espécies estudadas.



Figura 3.2.: Digrama de classificação científica das quatro espécies estudadas.

#### 3.3.1. Família Sciaenidae

A família dos Sciaenidaes (Teleósteo da classe Actinopterygii, ordem Perciformes) é composta por peixes de grande importância comercial. Algumas espécies, como corvina, goete e pescadas, são encontradas em abundância no mercado. No geral, esta família apresenta representantes costeiros, mais comumente encontrados em águas rasas da plataforma continental, próximas às desembocaduras de grandes rios, sobre fundos de areia ou lama. Algumas espécies ocorrem em águas estuarinas e outras são inteiramente confinadas à água doce. Jovens e adultos de várias espécies utilizam áreas estuarinas para crescimento e alimentação (Figueiredo & Menezes, 2000).

### - Stellifer rastrifer (cangoá)

A espécie *Stellifer rastrifer* (Bloch, 1790), comumente conhecida como cangoá, canganguá ou cangulo (Figura 3.3.), distribui-se desde a Colômbia até o litoral sul do Brasil (Figueiredo & Menezes, 2000), sendo encontrada em fundos de areia ou lama e em águas litorâneas e estuarinas a até 40 m de profundidade (Figueiredo & Menezes, 2000; Stellifer, 2008).



Figura 3.3.: Stellifer rastrifer (fonte: http://www.fishbase.org).

Sua alimentação consiste em pequenos peixes, crustáceos, cefalópodes que vivem próximos ao fundo, sendo carnívora de primeira ordem (Figueiredo & Menezes, 2000; Crispino, 2001). Gomes (2004) encontrou cumáceas, decápodes, amphipodas, crustáceos não identificados e peixes no conteúdo estomacal da espécie em questão, sendo os dois primeiros tidos como os principais componentes de sua alimentação. Diatomáceas, bivalves e braquiúras também foram encontradas, porém somente em estômagos de alguns espécimes. Atingem no máximo 200 mm e o comprimento de primeira maturação gonadal é bastante variado (Coelho *et al.*, 1985; Figueiredo & Menezes, 2000; Peres-Rios, 2001). Apresentam desova prolongada e parcelada ao longo do ano, especialmente em épocas de primavera e outono (Chaves & Vendel, 1997; Peres-Rios, 2001).

O S. rastrifer, embora tenha pouco significado comercial (Almeida & Branco, 2002), é muito importante na região da Baía de Santos, sendo

conhecido pela sua grande ocorrência e abundância (Paiva-Filho & Schimieglow, 1986), passando todo o seu ciclo de vida na região.

## - Nebris microps (pescada banana)

A espécie *Nebris microps* (Cuvier, 1830), popularmente conhecida como pescada-banana (Figura 3.4.), é distribuída desde a Flórida (EUA) até o sudeste do Brasil (Figueiredo & Menezes, 2000). É uma espécie demersal que chega a até 40 cm de comprimento, apresentando alguma representatividade comercial. Pode ser encontrado em águas costeiras e estuarinas, próximo aos fundos de areia e lama, em profundidades de até 50 m. Indivíduos juvenis são restritivos às águas salobras (Paiva-Filho & Cergole, 1989).



Figura 3.4..: Nebris microps (fonte: http://www.fishbase.org).

A espécie *Nebris microps* apresenta um hábito alimentar carnívoro, onde a base da sua alimentação é constituída principalmente de camarão, podendo se alimentar também de zoobentos (Nebris, 2008).

## - Micropogonia furnieri (corvina)

A *Micropogonia furnieri* (Desmarest, 1823), conhecida como "corvina", "corvina marisqueira", "murucaia", etc; é uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica, indo desde o México até a Argentina, passando pelo litoral brasileiro (Cousseau & Perrota, 1998).

A *M. furnieri* (Figura 3.5.) é importante representante dos recursos pesqueiros ao longo da plataforma continental do Atlântico, tanto na pesca artesanal quanto na industrial (Haimovici *et al.*, 1997; Alves & Luque, 2001). Devido à sua importância econômica, a *M. furnieri* é intensivamente estudada. No geral, ela é costeira, de hábitos demersais, encontrada em superfícies de fundos arenosos ou lamosos, em profundidades inferiores a 60m. Ocorre também em águas estuarinas principalmente quando são juvenis (Vazzoler, 1991). Comumente alcançam o tamanho de 50 cm (Godoy, 1987; Figueiredo & Menezes, 2000).



Figura 3.5.: Micropogonia furnieri (fonte: http://www.fishbase.org).

A dieta da *M. furnieri*, na fase adulta, é baseada em alimentos nectobentônicos, sendo esta reduzida durante a fase de desova, onde se alimenta de moluscos bivalves (Acuña *et* al., 1996). Mesmo assim, sua alimentação é composta basicamente de organismos de comunidades de fundo, como copépodas bentônicos, anfípodas e pequenos caranguejos. É classificada como generalista oportunista, embora tenham sido evidenciadas variações ontogenéticas em seu hábito alimentar, apresentando uma fase planctófaga e outra bentófaga (Vazzoler, 1991; Micropogonia, 2008).

#### 3.3.2. Família Tetraodontidae

Os indivíduos da Família dos Tetraodontidaes (Teleósteo da classe dos Actinopterygii, ordem Tetraodontiformes) são representados por peixes conhecidos como baiacus, capazes de inflar o corpo engolindo água ou ar. As espécies habitam geralmente águas costeiras e às vezes penetram em estuários. Algumas podem viver também em água doce (Figueiredo & Menezes, 2000)

### - Sphoeroides testudineus (baiacu-mirim)

A espécie *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758), também conhecida como baiacu-pintado, baiacu-pininga, tamboril corrotucho e cota (São Paulo), distribui-se pelo Atlântico desde Massachusetts (EUA) até o Brasil, onde há ocorrência desta espécie até Santa Catarina (Lucena & Lucena, 1982; Ishikawa-Ferreira, 1994).

O S. testudineus (Figura 3.6.) é freqüente e abundante em baías e estuários ao longo da costa brasileira. Possui uma boa capacidade osmorregulatória, ocorrendo em águas de salinidade 0 até 34. São comumente encontrados em baías, ribeiras e águas costeiras protegidas, camas de seagrass e águas salobras, podendo se enterrar na areia quando ameaçados (Figueiredo & Menezes, 2000).



Figura 3.6.: Sphoeroides testudineus (fonte: http://www.fishbase.org).

A espécie *Sphoeroides testudineus* é carnívora de hábito bentofágico com tendência à malacofagia, se alimentando principalmente de moluscos gastrópodes, bivalves e crustáceos. Pode se alimentar também (porém com menor abundância) de sipúnculos, poliquetas e restos de animais digeridos, assim como fragmentos de vegetais superiores e algumas espécies de microalgas, destacando-se as Diatomáceas (Vasconselos-Filho *et al.*, 1998; Chiaverini, 2008). Segundo Chiaverini (2008), a presença de fragmentos vegetais nos conteúdos estomacais pode estar associada com a voracidade de captura das presas entre as estruturas vegetais, implicando em um consumo acidental dos mesmos. A autora também observou que, em espécimes com tamanhos próximos aos usados no presente estudo, havia uma quantidade significativa de sedimentos presentes nos conteúdos estomacais. Segundo Zavala-Camim (1996), esta espécie pode ser considera eurifágica, já que possui vários itens alimentares.

#### 3.4. Análise de Metabólitos de PAHs (varredura de metabólitos)

#### 3.4.1. Método de análise dos metabólitos de PAHs (HPLC/F)

O método de análise dos metabólitos de PAHs em bile de peixes foi baseado de Krahn *et al.* (1984), com algumas modificações. Por ser a primeira vez que este método foi aplicado no Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM) do IO-USP, vários testes foram feitos a fim de otimizá-lo e adaptá-lo aos equipamentos adquiridos pelo laboratório.

Os padrões usados foram naftaleno (NAF), fenantreno (FEN) e benzo(a)pireno (BaP). No caso do último composto, o laboratório tinha apenas o FEN deuterado. Dessa forma, duas soluções de 1,0 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de NAF – uma com o composto deuterado e outra com o composto normal – foram feitas e injetadas no sistema HPLC/F, sendo comparados os tempos de retenções e as áreas obtidas para ambos padrões. Não foram observadas diferenças, mostrando que a presença de deutério não afeta as análises. Assim os padrões foram feitos inicialmente com as seguintes concentrações: BaP (1,0 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), NAF (1,0 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), FEN (1,0 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), sendo este deuterado.

Testaram-se os possíveis solventes e fluxos que poderiam ser usados para a eluição dos compostos. A escolha destes foi baseada na polaridade dos analitos e na coluna cromatográfica usada, sendo esta de fase reversa. Os solventes testados foram metanol, ácido acético/água (5µL.L<sup>-1</sup>) e acetonitrila. Conforme se observava a resposta obtida, aumentava-se o fluxo, diminuindo a corrida, porém separando menos os analitos; ou diminuía-se o fluxo, aumentando a corrida, porém separando mais os analitos. O gradiente de solventes usado durante a corrida, também foi trocado a fim de aumentar ou diminuir a viscosidade da fase móvel, otimizando a separação e o tempo de corrida. Metanol e ácido acético/água (5µL.L<sup>-1</sup>) foram escolhidos como os solventes que foram selecionados para maximizar a separação dos compostos, em um tempo relativamente baixo.

A temperatura do forno também foi testada a fim de melhorar a viscosidade dos solventes de arraste, otimizando a pressão do sistema e melhorando a separação dos compostos. Inicialmente os padrões foram injetados com a temperatura do forno a 30°C e esta temperatura foi subindo de 5 em 5 graus até chegar a 60°C, o limite aceito pela coluna. A temperatura que melhor separou os compostos, diminuindo a pressão e o tempo de corrida (19 minutos por amostra) foi 50°C.



Figura 3.7.: Gradiente de solventes usado para separação dos compostos.



Figura 3.8.: Fluxo usado para separação dos compostos

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos através de um método analítico, é necessário que haja sua validação, sem a qual, todos os resultados gerados tornam-se questionáveis. Esta pode ser feita aplicando-se o método em um material de referência certificado, de forma a assegurar a produção de resultados exatos e precisos (UNEP/IOC/IRLA/FAO, 1989). Como para metabólitos de PAHs em bile não há um material de referência certificado, é feita uma amostra controle. O desempenho do laboratório é considerado aceitável se os valores relatados nesta estiverem dentro de seus limites, definidos como mais ou menos o dobro dos desvios padrões de seus valores históricos (Sloan et al, 2006). A amostra controle usada nos testes e nas análises realizadas no presente trabalho foi a ASMBC (Atlantic Salmon Monterey Bay Crude Oil), cedida pela National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Esta foi usada na determinação dos melhores comprimentos de ondas ( $\lambda$ ) de excitação e emissão usadas em cada detector. Para isto, foram feitas injeções dos padrões de NAF, FEN e BaP com uma varredura de todos os λ possíveis para cada composto. O sistema de HPLC/F adquirido pelo LabQOM possui programas específicos que permitem a geração de gráficos como os das Figuras 3.9. e 3.10., que auxiliam na determinação do  $\lambda$  mais sensível para o tipo de composto que se está analisando. Inicialmente, os três pares de excitação/emissão do BaP, NAF, FEN, respectivamente, foram: 378/483 nm, 275/335 nm, 249/364 nm. Após configurar o equipamento com estes valores, injetou-se a ASMBC, para verificar se os resultados gerados

estavam coerentes. Os comprimentos de ondas encontrados para os metabólitos de BaP e NAF detectavam outros compostos na amostra que não eram de interesse, de forma que estes tiveram de ser adequados para 380/430 nm e 290/335 nm, respectivamente. No caso do FEN, os comprimentos de onda encontrados fizeram com que a sensibilidade de detecção do padrão na concentração de 1 ng.μL<sup>-1</sup> ultrapassasse a escala do detector. Com o objetivo de analisar todos os compostos na mesma escala, a concentração do padrão de FEN foi diminuída para 0,5 ng.μL<sup>-1</sup>



Figura 3.9.: Exemplo de varredura feita para verificação do comprimento de onda de emissão ótimo do BaP em 3D. Eixo x representa o tempo de retenção; eixo y, o comprimento de onda; e eixo z, sensibilidade.



Figura 3.10.: Exemplo de gráfico de varredura gerado para otimização dos comprimentos de ondas de emissão de BaP em 2D. A escala vai de vermelho (mais sensível) a azul (menos sensível). O eixo x representa o comprimento de onda e o eixo y, tempo de retenção.

Como foi citado anteriormente, este método de varredura não permite separar cada um dos metabólitos individuais provenientes de cada PAH estudado. Os dados gerados equivalem aos metabólitos totais que fluorescem nos comprimentos de ondas (excitação/emissão) usados na identificação dos PAHs originais (metabólitos equivalentes).

Após os testes de otimização do método terem sido finalizados, as amostras de bile (5  $\mu$ L) foram diretamente injetadas no sistema de HPLC da Agilent Technologies modelo 1200 series. Foi utilizado um filtro de pré-coluna de 0,84  $\mu$ L de volume interno (A-318, Upchurch Scientific), 1,57mm de diâmetro (2  $\mu$ m de porosidade), 1,57 mm de espessura e 6,35 mm de diâmetro total. Junto a este também foi usado uma pré-coluna empacotada com sílica C18 (30-40  $\mu$ m), 2 cm de volume interno (62  $\mu$ m de volume) e 2 mm de diâmetro interno. A coluna cromatográfica foi de fase reversa preenchida, com medidas de 4,6 x 150 mm e revestida de sílica C18 (Synergi 4 $\mu$  Hydro-RP 80Å, Phenomenex). O sistema de HPLC foi acoplado a três detectores de fluorescência (HPLC/F) da Agilent Technologies 1200 series programados para metabólitos de NAF, FEN e BaP. Esses compostos foram escolhidos para a análise por se tratar de um composto leve com 2 anéis benzênicos (NAF), um intermediário com 3 anéis benzênicos (FEN) e um pesado com 5 anéis benzênicos (BaP) entre os PAHs existentes, como foi citado anteriormente.

O metanol usado foi fabricado pela J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) com grau HPLC de pureza. A água usada na preparação do ácido acético/água (5μL/L) foi livre de compostos orgânicos através de sua destilação e purificação por um sistema de água Milli-Q, e o ácido acético glacial foi produzido pela Reagentes Analíticos Dinâmica com grau P.A. (analítico) de pureza. O BaP, o NAF e o FEN usados na preparação do padrão foram fornecidos pela Supelco (EUA).

### 3.4.2. Controle Analítico para análise de metabólitos de PAHs

Para verificar o desempenho do sistema HPLC/F, 5 ou mais réplicas da solução padrão de NAF, FEN e BaP foram injetadas antes da análise das amostras. A média da resposta para cada composto da solução padrão deveria ter um desvio padrão relativo de 0-5% para serem aceitas.

Injeções de metanol (branco) e da amostra controle (ASMBC) eram feitas no início, a cada dez amostras injetadas e no final de cada seqüência de injeções de amostras. As concentrações da amostra controle deveriam estar dentro do limite controle (o dobro do desvio padrão da média das concentrações observadas em injeções anteriores) e o branco deveria ter uma concentração 10% menor que a dos analitos para considerar que o desempenho do HPLC/F era aceitável.

A cada seqüência de amostras injetada, foi feita uma amostra em duplicata para avaliar a precisão analítica. Para estas, a seqüência só seria considerada válida se as concentrações entre as duplicatas tivessem um desvio padrão relativo menor que 10% entre elas.

Caso algum dos itens citados acima não estivesse de acordo com o desejado, procedimentos de manutenção do sistema eram realizados antes

das injeções das amostras, repetindo aquelas que foram injetadas durante o período ao qual o sistema não estava com um bom desempenho.

O limite de detecção (LD) do método foi determinado para cada grupo de metabólitos equivalentes como sendo 3 vezes o desvio padrão da média das concentrações de 6 réplicas da solução padrão. O limite de quantificação (LQ) do método foi calculado como sendo 3 vezes o LD. A Tabela 3.2. mostra os valores de LD e LQ determinados para o método no presente trabalho para os 3 metabólitos equivalentes analisados.

Tabela 3.2.: Valores de LD e LQ do método para os metabólitos equivalentes (µg.g<sup>-1</sup>) analisados nos presente trabalho.

| Metabólitos equivalentes | LD   | LQ   |
|--------------------------|------|------|
| FEN                      | 0,12 | 0,36 |
| BaP                      | 0,09 | 0,27 |
| NAF                      | 0,33 | 0,99 |

## 3.5. Análise de proteínas biliares totais

Para o presente estudo, as análises de proteínas biliares totais foram realizadas segundo o método proposto por Fryer *et al.* (1986) (adaptado de Lowry *et al.*, 1951).

As amostras de bile foram diluídas em água destilada (1:100), e em cada micro-poço da placa, adicionou-se 100  $\mu$ L desta solução e 25  $\mu$ L de solução de "cobre-Lowry", sendo esta feita de 50  $\mu$ L de solução 5% CuSO<sub>4</sub>, 50  $\mu$ L de solução 10% de tartarato de sódio e 5 mL de solução 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em NaOH 0,5N. A solução formada foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo adicionados, após o período de incubação, 10  $\mu$ L de solução de Folin, sendo esta feita com 1mL de reagente Folin ciocauteau e 1 mL de NaOH 0,1N. Os reagentes usados tinham grau P.A. de pureza. O Tartarato de sódio foi produzido pela Synth – Diadema, SP, Brasil e os demais reagentes foram produzidos pela Reagentes Analíticos Dinâmica – São Paulo, SP, Brasil.

A placa foi novamente incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e a leitura foi feita em um espectrofotômetro com multi-leitor de micro-

placas (Asys Expert Plus) a 620 nm. Para cada amostra foram analisadas 3 réplicas. Albumina de soro bovino (Inlab – São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como solução padrão para curva de calibração.

A Figura 3.11. mostra o fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares.



Figura 3.11.: Fluxograma do método usado para análise de proteínas biliares segundo Fryer *et al.* (1986) (adaptado de Lowry *et al.*, 1951).

### 3.5.1. Controle Analítico para análise de proteínas biliares

A amostra controle usada para verificar as análises de proteínas biliares totais foi a mesma utilizada para análise dos metabólitos de PAHs (ASMBC). A fim de avaliar a exatidão das análises, uma amostra controle era feita a cada placa analisada, sendo que a concentração de proteínas biliares encontrada para esta deveria estar em até 25% da média da concentração estabelecida a fim de considerar válidas as análises das amostras.

Para verificar a contaminação, era analisada uma amostra de água destilada (branco), devendo esta conter, no final do experimento, uma

absorbância menor que 0,05. Para verificar a precisão analítica, foi feita uma amostra em duplicata, devendo os resultados das amostras ter uma diferença de até 30% entre suas concentrações. A curva analítica foi considerada aceita quando o coeficiente de correlação entre seus pontos (5 pontos) foi maior que 0,990.

Caso algum destes critérios não fosse encontrado, a placa era lida novamente no espectrofotômetro ou outra placa era preparada.

#### 3.6. Análise de enzimas

As análises da atividade EROD nos fígados dos peixes coletados foram feitas segundo Hodson *et al.* (1991), com algumas adaptações. A Figura 3.12. mostra o fluxograma do método usado para análise da atividade enzimática.

Aproximadamente 0,5 g das amostras de fígado foram descongeladas e maceradas em tampão (KCI-HEPES), mantendo a relação de 1 g de fígado para 4 mL de tampão, e colocado em uma centrífuga Eppendorf 5417R a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado a 9.500 rpm por 30 minutos. Desta última centrifugação, 40  $\mu$ L do sobrenadante (fração mitocondrial chamada de S-9) foram transferidos para um tubo Eppendorf, junto a 1920  $\mu$ L de solução etoxiresorufina (7-ER/EROD) a 2  $\mu$ M. A solução resultante foi incubada de 2 a 3 minutos na temperatura de medição do espectrofotômetro Cintra 10<sub>e</sub>, misturando-se, em seguida, 40  $\mu$ L de NADPH (25 mg.ml<sup>-1</sup> em tampão de ressuspensão) para determinação da atividade enzimática. Por fim, registrouse a absorbância durante 3 minutos, sendo o resultado final gerado através da variação de absorbância em função do tempo da solução em um espectrofotômetro ajustado com comprimento de onda de 572 nm.



Figura 3.12.: Fluxograma do método usado para análise da atividade EROD segundo Hodson *et al.* (1991).

### 3.7. Amostra controle (BCC)

As análises feitas no presente trabalho tiveram como amostra controle a ASMBC. Porém, como o volume desta amostra era limitada, houve a necessidade de se produzir outra amostra controle, com o intuito de dar continuidade a novos trabalhos no LabQOM. Para isto, foram coletados 97 indivíduos da espécie *Sphoeroides testudineus* em Cananéia, Litoral Sul de São Paulo, com o auxílio do barco de pesquisa Velliger II da Universidade de São Paulo.

A coleta destes indivíduos foi feita com uma rede de arrasto de fundo tipo OT (Otter Trawl) durante 5 minutos. Os animais, assim que capturados, eram selecionados conforme a espécie e o estado físico, sendo colocados em recipientes contendo água com aerador e transportados até a Base de Pesquisas Oceanográficas "João de Paiva Carvalho", do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, em Cananéia.

Dentre os peixes coletados, 28 indivíduos, com tamanhos variando de 107 a 216 mm, foram usados para exposição controle, 33 indivíduos, com tamanhos variando de 84 a 226 mm, foram usados para exposição ao óleo, e 36 indivíduos, com tamanhos variando de 158 a 254, tiveram sua bile coletada logo após a captura, não sendo expostos. Os 33 indivíduos usados para exposição ao óleo e os 28 indivíduos usados para a exposição controle foram aclimatados por 24 horas. Ambos tiveram exposição estática e com aerador, sendo sacrificados após 48 horas. A água usada nos tanques foi adquirida no canal de Cananéia em frente à base usada como apoio. Os indivíduos expostos ao óleo foram submetidos a uma concentração de 25 µg.L<sup>-1</sup> de óleo bruto (Carmópolis) em um tanque com capacidade de 500 litros, e os indivíduos para exposição controle não foram submetidos à contaminação, permanecendo em um tanque separado com a mesma capacidade em volume. Nenhum indivíduo morreu durante a exposição.

A bile dos peixes expostos, dos peixes não expostos e a dos peixes que tiveram sua bile coletada logo após a captura foram analisadas, sendo 40 réplicas injetadas no sistema já estável e com a metodologia de análise definida. Como o valor de metabólitos presentes nos peixes expostos ficou alto, misturou-se esta amostra com as que continham bile dos peixes não expostos, homogeneizando a mistura e injetando 40 réplicas novamente. Foi utilizada como controle para estas análises a amostra ASMBC. As concentrações dos metabólitos obtidos ficaram na mesma ordem de grandeza que as concentrações da amostra controle da NOAA, sendo então esta aceita como controle.

Como a amostra padrão foi feita com Baiacú exposto ao óleo Carmópolis em Cananéia, esta foi denominada BCC (Baiacú de Cananéia exposto ao óleo Carmópolis). Na Tabela 3.3. estão relacionadas as médias, os desvios padrões e os valores limites máximos e mínimos admitidos para cada grupo de metabólitos e para as proteínas medidas na amostra controle feita.

|                     | FEN   | BaP  | NAF    | Proteínas |
|---------------------|-------|------|--------|-----------|
| Média               | 88,62 | 2,58 | 456,67 | 10,0      |
| Desvio padrão       | 1,75  | 0,08 | 10,17  | 0,83      |
| Valor limite máximo | 92,11 | 2,74 | 477,00 | 11,7      |
| Valor limite mínimo | 85,13 | 2,42 | 436,34 | 9,37      |

Tabela 3.3.: Média, desvio padrão e valores limites máximo e mínimo admitidos para metabólitos de FEN, BaP e NAF (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) e de proteínas totais (em mg.mL<sup>-1</sup>), na amostra controle (BCC).

Com o passar do tempo de uso do BCC, observou-se uma diferença na concentração dos metabólitos e das proteínas biliares. Esta diferença não foi devida à sensibilidade do equipamento, já que vários testes foram realizados a fim de encontrar o que deveria estar mudando os valores da amostra controle. Acredita-se que o que tenha ocorrido é uma degradação dos analitos de interesse através da interação destes com outros compostos também presentes na bile do *S. testudineus*, como, por exemplo, o veneno que esta espécie é capaz de produzir. Dessa forma, esta amostra não deverá ser usada para controle das análises, devendo ser feita outra com uma espécie diferente.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. Biodisponibilidade dos PAHs na Baía de Santos

Na Tabela 4.1. e na Figura 4.1. estão apresentadas as concentrações dos metabólitos de PAHs biliares totais e dos metabólitos de NAF, FEN e BaP encontrados nas diferentes espécies, locais e meses amostrados.

Tabela 4.1: Concentração de metabólitos biliares de PAHs totais (MT) e de metabólitos de NAF (Met. NAF), FEN (Met. FEN) e BaP (Met. BaP), em μg.g<sup>-1</sup> de bile, encontrados nas espécies estudadas na Baía de Santos (n= número de indivíduos usados na amostra; RO= Região Oeste; RC= Região Central; RL= Região Leste).

|          | Mês       | n      | região | МТ  | Met. NAF | Met. FEN | Met. BaP |
|----------|-----------|--------|--------|---|----------|----------|----------|
|          | l         | 12     | RO     | 181   | 160      | 20,3     | 0,95     |
|          | Junno     | 6      | RC     | 144   | 130      | 14,2     | 0,47     |
| P        | Agosto    | 13     | RC     | 275   | 210      | 64,1     | 1,20     |
| strifo   | Setembro  | 8      | RC     | 69,5  | 63,0     | 6,03     | 0,52     |
| ras      |           | 7      | RO     | 436   | 410      | 25,2     | 0,88     |
| Ś        | Outubro   | 4      | RL     | 195   | 180      | 15,2     | 0,41     |
|          | Nevembro  | 3      | RO     | Argião MT Met. NAF Met. FEN Met. BaP   RO 181 160 20,3 0,95   RC 144 130 14,2 0,47   RC 275 210 64,1 1,20   RC 69,5 63,0 6,03 0,52   RO 436 410 25,2 0,88   RL 195 180 15,2 0,41   RO 190 180 10,2 0,29   RL 65,5 60,0 5,34 0,18   RC 96,8 86,1 10,1 0,76   RO 148 130 18,2 0,85   RC 79,5 63,2 16,3 0,52   RO 350 330 19,1 0,58   RC 399 380 19,2 0,41   RC 260 250 10,5 0,090   RC 106 95,2 10,2 0,51   < |          |          |          |
|          | Novembro  | 3      | RL     | 65,5  | 60,0     | 5,34     | 0,18     |
|          | Julho     | 2      | RC     | 96,8  | 86,1     | 10,1     | 0,76     |
|          | Cotombro  | 5      | RO     | 148   | 130      | 18,2     | 0,85     |
| ieri     | Setembro  | 5      | RC     | 79,5  | 63,2     | 16,3     | 0,52     |
| M. furni |           | 6      | RO     | 350   | 330      | 19,1     | 0,58     |
|          | Outubro   | 4      | RC     | 399   | 380      | 19,2     | 0,41     |
|          | Novembro  | 3      | RC     | 260   | 250      | 10,5     | 0,090    |
|          | Dezembro  | 3      | RC     | 106   | 95,2     | 10,2     | 0,51     |
|          | Agosto    | 4      | RC     | 96,1  | 90,0     | 5,83     | 0,26     |
| icrops   | Outubro   | 4      | RO     | 295   | 280      | 15,2     | 0,31     |
|          | Outubro   | 10     | RC     | 245   | 230      | 15,7     | 0,29     |
| Ē        |           | 2      | RC     | 88,4  | 84,3     | 4,35     | 0,11     |
| Z        | Novembro  | 4      | RC     | 129   | 120      | 8,43     | 0,45     |
|          |           | 2      | RL     | 272   | 270      | 1,62     | 0,42     |
|          |           | 1      | PO     | 143   | 130      | 13,1     | 0,39     |
| SL       |           | 1      | RU     | 252   | 220      | 31,3     | 0,80     |
| ine      | Novembro  | 1      |        | 299   | 260      | 37,4     | 1,50     |
| studii   | NUVEINDIO | 1      | RU     | 589   | 500      | 86,2     | 3,30     |
| tes      |           | 1<br>1 | וס     | 204   | 180      | 23,1     | 0,78     |
| S.       |           |        | KL     | 187   | 170      | 16,5     | 0,57     |
|          | Dezembro  | 1      | RL     | 104   | 93,2     | 10,2     | 0,50     |



Figura 4.1.: Gráficos do tipo Box-and-whisker plots obtidos para os MT, de NAF, FEN e BaP (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontrados nas amostras coletadas na Baía de Santos.

As concentrações de metabólitos totais encontradas na Baía de Santos são próximas às observadas em locais onde houve conhecida introdução de PAHs (Escartin & Porte, 1999 a, b, c; Silva *et al*, 2006). Silva *et al.* (2006), por exemplo, ao estudarem a contaminação destes compostos no Canal de São Sebastião, encontraram, em *Cyclichthys spinosus* e *Prionotus nudigula*, valores de metabólitos totais que variaram de 96,36 a 283,10 e 273,29 a 525,28  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de bile, respectivamente, afirmando que todos os indivíduos coletados apresentaram evidências de exposição aos PAHs. A concentração encontrada por Escartín & Porte (1999a) em *Salmo truttas* produzidos em fazendas onde, em princípio, não havia contaminação por PAHs foi de 1,4  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de bile. Embora as espécies estudadas na Baía de Santos sejam diferentes das estudadas por Escartin & Porte (1999a) e por Silva *et al.* (2006), a maioria das amostras coletadas nesta região obteve valores com ordens de grandeza próximas às encontradas no Canal de São Sebastião, ficando 47 a 121 vezes acima do valor encontrados nos *S. truttas*.

Quanto aos metabólitos individuais, as concentrações de metabólitos de NAF encontradas por Escartin & Porte (1999a), em peixes coletados em lagos de altitude da Europa, variaram de 75 a 243 µg.g<sup>-1</sup> de bile. Os locais estudados por estes autores são pertencentes a regiões remotas, sem fonte direta de contaminação. Os maiores valores foram encontrados para lagos cuja principal fonte de NAF é o transporte atmosférico. Já para regiões costeiras do Mediterrâneo, Escartin e Porte (1999b) encontraram, em *Mullus barbatus* e *Serranus cabrilla*, concentrações de metabólitos de NAF e BaP que variaram, respectivamente, de 15,4 a 378 e de 0,018 a 1,3 µg.g<sup>-1</sup> de bile. McCain *et al.* (1990) encontraram, em *Oncorhynchus tshawytscha* coletados em estuários urbanos dos Estados Unidos, valores de concentração de metabólitos de BaP que variaram de 0,04 µg.g<sup>-1</sup>, para região de referência (Rio Nisqually), a 1,9 µg.g<sup>-1</sup> de bile, para a região de maior contaminação (Duwamish Waterway - Seatle).

Os valores encontrados de metabólitos de NAF na Baía de Santos ficaram superiores ou intermediários às concentrações encontradas por Escartin & Porte (1999a) e com a mesma ordem de grandeza das encontradas por Escartin & Porte (1999b). As concentrações de metabólitos de BaP da Baía de Santos ficaram superiores à da área de referência estudada por McCain *et al.* (1990) e Escartin & Porte (1999b), mas com ordens de grandeza próximas às encontradas em áreas contaminadas.

Krahn *et al.* (1992), ao estudarem metabólitos de PAHs biliares em peixes coletados no Alasca após 1 ano do derrame do "Prince William" (41

milhões de litros de petróleo), encontraram concentrações que variaram de 44 a 380 µg.g<sup>-1</sup> de bile para metabólitos de FEN, e de 270 a 2600 µg.g<sup>-1</sup> de bile para metabólitos de NAF. Krahn et al. (1986), ao analisarem peixes coletados no Rio Columbia, após um derrame de 640 mil litros de óleo, encontraram 200 µg.g<sup>-1</sup> de bile de metabólitos de NAF, 210 µg.g<sup>-1</sup> de bile de metabólitos de FEN e 2,1 µg.g<sup>-1</sup> de bile de metabólitos de BaP. As concentrações obtidas na Baía de Santos estiveram, na sua maioria, abaixo das encontradas no Alasca. Quando comparadas com o Rio Columbia, os metabólitos de FEN, de BaP, e a maior parte das concentrações de metabóltios de NAF da Baía de Santos estiveram abaixo dos valores encontrados por Krahn et al. (1986). Por tratarem de derrames, as contaminações no Alasca e no Rio Columbia foram mais intensas e pontuais que a da Baía de Santos. Esta região apresenta introduções de PAHs provindas de atividades cotidianas, sendo portanto esperados níveis de metabólitos menores do que aqueles encontrados em regiões onde ocorrem derrames, como é o caso dos trabalhos realizados por Krahn et al. (1986, 1992).

Silva et al. (2006), encontraram no Canal de São Sebastião, região portuária, valores médios de 290  $\pm$  200; 18  $\pm$  14 e 0,97  $\pm$  1,9  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de bile para metabólitos de NAF, FEN e BaP respectivamente. Das amostras analisadas na Baía de Santos, algumas obtiveram concentrações maiores de metabólitos de FEN e menores de metabólitos de NAF quando comparadas com o Canal de São Sebastião. Esta diferença pode ser devida ao fato de que, no Canal de São Sebastião a maior fonte de PAHs é petrogênica (Medeiros & Bícego, 2004b), enquanto que na Baía de Santos, além de fontes petrogênicas, há também introduções pirogênicas destes compostos (Medeiros & Bícego, 2004a). PAHs provindos do petróleo tendem a ser mais leves que os provindos da queima (Baumard et al. 1998). Dessa forma, locais contaminados por fontes pirolíticas apresentarão maiores concentrações de metabólitos de BaP quando comparados com locais contaminados por fontes petrogênicas, que apresentarão maiores concentrações de metabólitos de NAF. A maioria das concentrações de metabólitos biliares da Baía de Santos apresentou valores que estavam intermediários ou superiores às médias obtidas por Silva et al. (2006).

#### 4.2. Variação interespecífica, espacial e temporal dos metabólitos biliares

Em estudos ambientais a amostragem é susceptível às condições do ambiente estudado. Fatores como as condições meteorológicas e a presença ou ausência do alvo a ser amostrado dificultam na elaboração de um planejamento adequado de coleta (número de amostras e replicatas, espécies a serem amostradas, etc). No presente trabalho, apesar do esforço de coleta, não foi possível obter todas as espécies alvo em todos os meses e áreas de abrangência do estudo. Isto dificultou a visualização da variação interespecífica, sazonal e espacial de contaminação.

Como foram coletados poucos peixes da mesma espécie, não foi possível a replicata das amostras, dificultando a realização de cálculos estatísticos mais consistentes. Além disso, devido ao pequeno volume de bile de cada organismo, houve a necessidade de agrupar indivíduos de diferentes sexos, estágios de maturação e tamanhos, o que aumentou a variabilidade nas concentrações de metabólitos biliares.

Desta forma, para averiguar as diferenças interespecíficas, sazonais e espaciais entre os níveis de metabólitos, foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, considerando o nível de significância de 95%.

#### 4.2.1. Variação entre as espécies estudadas

A fim de verificar as diferenças interespecíficas nas concentrações de metabólitos, devido ao pequeno número de amostras, estas foram agrupadas somente por espécie, não considerando o local e o mês de coleta. Nas Figuras 4.2., 4.3., 4.4. e 4.5. estão apresentados os gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais e para os metabólitos de NAF, de FEN e de BaP, encontrados nas amostras de *S. rastrifers*, *M. furnieris*, *N. microps* e *S. testudineus*.



Figura 4.2.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos totais (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontrados nas espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* coletadas na Baía de Santos.



Figura 4.3.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de NAF (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontrados nas espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* coletadas na Baía de Santos.



Figura 4.4.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de FEN (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontrados nas espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* coletadas na Baía de Santos.



Figura 4.5.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para os metabólitos de BaP (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontrados nas espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* coletadas na Baía de Santos.

Observa-se nestas Figuras que o perfil de distribuiçãos dos metabólitos totais é semelhante ao perfil dos metabólitos de NAF. Isso se deve ao fato de que os metabólitos biliares de NAF apresentam elevadas concentrações quando comparados com os de FEN e BaP, fazendo com que a concentração dos totais, que é a somatória dos individuais, seja pouco influenciada por estes.

Estudos feitos usando metabólitos biliares como biomarcador, no geral encontram maiores concentrações de NAF, concentrações intermediárias de FEN e menores concentrações de BaP (Krahn et al., 1986, 1992; Escartin & Porte, 1999 a,b,c; Silva et al., 2006). Na Baía de Santos, a concentração de NAF é de 1 a 2 ordens de grandeza maior que a de FEN, e de 3 a 4 ordens de grandeza maior que a de BaP. Quanto maior a lipofilicidade e a hidrofobicidade de um composto aromático, menor é sua assimilação do ambiente e maior seu fator de bioconcentração (BFC) (Roubal et al, 1977, 1978; Korn & Rice, 1981), diminuindo a concentração de metabólitos. Como estes fatores aumentam com o peso molecular, compostos mais leves, como o NAF, tendem a ser menos lipofílicos e hidrofóbicos que compostos de peso molecular intermediário, como o FEN, que por sua vez é menos lipofílico e hidrofóbico que compostos mais pesados, como o BaP (Eisler, 1987). Dessa forma, as características químicas do NAF facilitam na assimilação deste composto e na sua metabolização, fazendo com que suas concentrações de metabólitos sejam maiores que as de FEN e que as de BaP, tendo este as menores concentrações.

Após aplicar nos dados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, observou-se que não houve variação significativa entre as espécies quanto à concentração de metabólitos de NAF e de metabólitos totais. A concentração dos metabólitos de FEN e BaP foi mais elevada na espécie *S. testudineus* e menor na espécie *N. microps*. Para as espécies *S. rastrifer* e *M. furnieri* estes dois metabólitos apresentaram concentrações intermediárias e sem variação significativa.

A absorção dos contaminantes e a eficiência de metabolismo podem mudar entre as espécies (Escartin & Porte, 1999b). Fatores como hábito alimentar e habitat alteram o grau de exposição aos contaminantes, fazendo com que diferentes espécies apresentem diferentes concentrações de metabólitos em sua bile (Varanasi *et al.*, 1989). Dentre as espécies estudadas na Baía de Santos todas são costeiras, de hábito demersal, encontradas em fundo de lodo, areia e cascalho, com alimentação baseada em organismos bentônicos (Carvalho-Filho, 1992; Vasconselos-Filho *et al.*, 1998; Figueiredo & Menezes, 2000; Crispino, 2001; Chiaverini, 2008), de forma que estes fatores não são responsáveis pelas diferenças nas concentrações encontradas.

A assimilação de diferentes PAHs presentes no ambiente também pode ser afetada pela mobilidade dos indivíduos coletados (Escartin & Porte, 1999b). O S. testudineus apresenta baixa capacidade de natação. Seu contato com o sedimento é maior, aumentando a absorção de compostos de médio e alto peso molecular, como o caso do FEN e do BaP. Estes são mais hidrofóbicos que os compostos de baixo peso molecular (como o NAF), associando-se preferencialmente à matéria orgânica em suspensão e depositando-se no fundo (Porte & Albaigés, 1993). Portanto, uma vez que a exposição do S. testudineus aos compostos mais pesados é maior, maiores poderão ser as concentrações de metabólitos de FEN e BaP. O N. microps, ao contrário do S. testudineus, apresenta uma alta mobilidade e capacidade de natação. O contato desta espécie com o sedimento é menor, fazendo com que sua exposição ao FEN e ao BaP diminua. Além disso, esta espécie não é residente somente da Baía de Santos. O N. microps também é encontrado em regiões que apresentam menores introduções de contaminantes, como no caso da plataforma continental adjacente à Baixada Santista.

A ausência de diferenças interespecíficas na concentração dos metabólitos de NAF está associada às características químicas do PAH em questão. O NAF apresenta maior solubilidade quando comparado com o FEN e o BaP (Eisler, 1987). Além disso, como já explicado anteriormente, por se tratar de um composto menos lipofílico, seu BFC é menor, o que aumenta o grau de metabolismo deste composto quando comparado aos outros (Varanasi *et al.*, 1989). Assim, as características do NAF facilitam sua assimilação e metabolização, fazendo com que as quatro espécies estudadas não apresentem diferenças significativas nas concentrações de seus metabólitos.

#### 4.2.2. Variação espacial

Para avaliar a variação espacial na concentração de metabólitos bilares de PAHs, as amostras foram agrupadas por local de coleta (RO, RC e RL), não considerando a espécie e o mês amostrado. Este procedimento foi adotado em função do número reduzido de amostras obtidas. Nas Figuras 4.6., 4.7., 4.8. e 4.9. estão apresentados gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais, de NAF, FEN e BaP, encontrados nas diferentes áreas amostradas.



Figura 4.6.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos totais (em µg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL.



Figura 4.7.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de NAF (em µg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL.



Figura 4.8.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de FEN (em µg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL.



Figura 4.9.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de BaP (em µg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas nas RO, RC e RL.

Após aplicar nos dados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, observou-se que não houve variação significativa dos metabólitos totais de NAF, FEN e BaP entre as áreas RO, RC e RL.

Como as espécies analisadas são demersais, as concentrações de metabólitos podem estar relacionadas com a concentração de PAHs nos sedimentos. Na Tabela 4.2., estão apresentadas as concentrações de PAHs encontradas em sedimentos coletados na Baía de Santos durante a época de amostragem das biles usadas no presente estudo. Tais resultados foram apresentados em relatório técnico do projeto ECOSAN ("A influência do complexo estuarino da Baixada Santista sobre o ecossistema da plataforma continental adjacente") entregue à Fundação de Amparo à Pesquisa do Esatado de São Pualo (FAPESP).

Tabela 4.2.: Concentrações de Hidrocarbonetos Aromáticos encontradas em amostras de sedimento da Baía de Santos (ng.g<sup>-1</sup> peso seco). <L.D.M. = valores menores que o limite de detecção do método. PAHs totais = somatória dos NAF, FEN, BaP e seus compostos metilados. Pontos 1 e 6 correspondem à RL – cor lilás; 2 e 5 à RC – cor verde; 3 e 4 à RO – cor azul. (Fonte: Relatório técnico apresentado à FAPESP referente ao projeto ECOSAN - "A influência do complexo estuarino da Baixada Santista sobre o ecossistema da plataforma continental adjacente –

| Compostos          | #3      | #4      | #2      | #5      | #1      | #6      |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                    | R       | 0       | R       | С       | R       | L       |
| Naftaleno          | < L.D.M |
| metil-naftaleno    | < L.D.M | < L.D.M | < L.D.M | 1,06    | 1,18    | < L.D.M |
| dimetil-naftaleno  | < L.D.M | < L.D.M | 1,30    | 2,91    | 4,21    | < L.D.M |
| trimetil-naftaleno | < L.D.M |
| Fenantreno         | 1,20    | < L.D.M | 6,35    | 10,26   | 7,56    | 1,71    |
| metil-fenantreno   | < L.D.M | < L.D.M | < L.D.M | 11,1    | < L.D.M | < L.D.M |
| benzo(a)pireno     | 2,11    | < L.D.M | 16,4    | 28,4    | 15,3    | 2,65    |
| PAHs totais        | 3,31    | < L.D.M | 24,1    | 53,7    | 28,3    | 4,36    |

#### PRONEX-CNPQ/FAPESP n° 03/09932-1).

Observa-se que há diferenças de concentração de PAHs nos sedimentos. As maiores concentrações estão na RC, a RL apresenta concentrações intermediárias e a RO, menores concentrações. Dessa forma, os níveis de metabólitos biliares encontrados não estão associados aos PAHs presentes no sedimento onde os peixes foram amostrados.

Como as espécies estudadas apresentam certa mobilidade, as concentrações de metabólitos encontradas nas amostras de bile não correspondem necessariamente às áreas específicas em que os peixes foram amostrados (RO, RC e RL). Porém, com exceção do *N. microps* que migra para fora da Baía de Santos, os peixes usados no presente estudo não saem da região. Dessa forma, embora as concentrações de metabólitos biliares encontradas não possam ser associadas a uma área específica da Baía de Santos, estas permitem avaliar se há biodisponibilidade de PAHs na região como um todo.

#### 4.2.3. Variação temporal

Para facilitar os cálculos estatíticos feitos na análise da variação temporal de metabólitos na Baía de Santos, as amostras foram reunidas em 3 grupos: junho/julho/agosto (jun/jul/ago); setembro/outubro (set/out) e novembro/dezembro (nov/dez). Nas Figuras 4.10., 4.11. 4.12. e 4.13. estão apresentados gráficos do tipo box-and-whisker plots feitos para os metabólitos totais, de NAF, FEN e Bap, encontrados nas amostras de *S. rastrifers, M. furnieris, N. microps* e *S. testudineus*.



Figura 410.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos totais (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas entre os meses de jun/jul/ago; set/out; nov/dez.



Figura 4.11.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de NAF (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas entre os meses de jun/jul/ago; set/out; nov/dez.



Figura 4.12.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de FEN (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas entre os meses de jun/jul/ago; set/out; nov/dez.



Figura 4.13.: Gráfico do tipo Box-and-whisker plots para as concentrações de metabólitos de BaP (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) encontradas entre os meses de jun/jul/ago; set/out; nov/dez.

Após aplicar nos grupos o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, verificou-se que não houve variação significativa entre os meses para os metabólitos analisados.

Sabe-se que um dos fatores que pode afetar no metabolismo dos PAHs são as características biológicas dos peixes amostrados (Varanasi *et al.*, 1989). Como houve a necessidade de se agrupar indivíduos de sexo, tamanhos, idades e estágios de maturação diferentes, estes fatores bióticos podem ter agido em conjunto, de modo que a variação temporal em função de períodos de reprodução, maturação, etc; foram mascarados.

O metabolismo dos PAHs também está associado às diferenças sazonais de temperatura, aumentando em períodos quentes (verão), e diminuindo em períodos frios (inverno) (Eggens *et al.*, 1996; Hylland *et al.*, 1996; Rotchell *et al.*, 1999). A falta de diferenças na concentração dos metabólitos biliares ao longo dos meses estudados pode ser devida ao pequeno tempo de abrangência do estudo (junho a dezembro), avaliando somente os meses de inverno e primavera. As características climáticas da

região também podem ter influenciado, já que a Baía de Santos não apresenta variações de temperatura tão acentuadas ao longo do ano como em regiões temperadas, onde a grande parte dos estudos encontrados na literatura foi feita.

### 4.3. Metabólitos de PAHs x proteínas biliares

Na Tabela 4.3. estão apresentados os resultados obtidos de metabólitos totais de PAHs biliares, em  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de bile, e as proteínas totais, em mg.mL<sup>-1</sup>, das amostras de *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* analisadas para a Baía de Santos.

O status alimentar dos peixes pode afetar a concentração de metabólitos biliares, já que a presença de alimentos no tubo digestivo provoca a liberação de bile no intestino, aumentando o volume da vesícula entre as refeições e diminuindo após o peixe ter se alimentado (Richardson *et al.*, 2004). Para comparar os resultados encontrados em peixes com diferentes condições alimentares, as proteínas biliares podem ser usadas como método de normalização (Collier & Varanasi, 1991; Brumley *et al.*, 1998). Porém, o tipo e a quantidade de alimento consumido, o tempo de exposição, o sexo, a idade, etc; também contribuem na variabilidade da concentração de metabólitos biliares e estes fatores não são corrigidos pela normalização pelas proteínas (Ariese *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2004; Vuorinem *et al.*; 2006).

Para a normalização estar correta, o parâmetro usado (proteínas biliares) deve variar juntamente com o alvo estudado (metabólitos de PAHs biliares), fazendo com que haja a necessidade de se avaliar o procedimento através da correlação obtida entre a concentração de metabólitos e a de proteínas biliares (Silva *et al.;* 2006; Kamman, 2007). Caso não haja correlação, a necessidade da normalização se torna questionável, já que, estatisticamente, não há uma relação satisfatória entre as medidas.

Nas Figuras 4.14., 4.15., 4.16. e 4.17. estão apresentadas as relações de Spearman entre as proteínas biliares e os metabólitos biliares totais calculadas para as espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus*, respectivamente.

Tabela 4.3.: Níveis de metabólitos totais (MT – somatória dos três metabólitos analisados) (em µg.g<sup>-1</sup> de bile) e Proteínas biliares Totais (PT) (em mg.mL<sup>-1</sup>) encontrados nas amostras de *S. rastrifer*, *M. furnieri*, *N. microps* e *S. testudineus* coletados na Baía de Santos.

|          | Espécie                 | Área | МТ  | РТ  |
|----------|-------------------------|------|-----|-----|
| lunho    | Stellifer rastrifer     | RO   | 181 | 4,4 |
| Junno    | Stellifer rastrifer     | RC   | 145 | 3,6 |
| Julho    | Micropogonia furnieri   | RC   | 97  | 3,6 |
| Agosto   | Nebris microps          | RC   | 96  | 2,9 |
| Agosto   | Stellifer rastrifer     | RC   | 275 | 5,9 |
|          | Micropogonia furnieri   | RO   | 140 | 2,6 |
| Setembro | Micropogonia furnieri   | RO   | 157 | 4   |
| Setembro | Stellifer rastrifer     | RC   | 70  | 3,4 |
|          | Micropogonia furnieri   | RC   | 80  | 3,9 |
|          | Micropogonia furnieri   | RO   | 350 | 3,8 |
|          | Nebris microps          | RO   | 295 | 3,9 |
| Outubro  | Stellifer rastrifer     | RO   | 436 | 5,3 |
| Outubio  | Nebris microps          | RC   | 245 | 4,7 |
|          | Micropogonia furnieri   | RC   | 399 | 4,2 |
|          | Stellifer rastrifer     | RL   | 195 | 3,2 |
|          | Stellifer rastrifer     | RO   | 190 | 3,5 |
|          | Sphoeroides testudineus | RO   | 143 | 2,2 |
|          | Sphoeroides testudineus | RO   | 252 | 3,3 |
|          | Nebris microps          | RC   | 88  | 3,1 |
| Novembro | Sphoeroides testudineus | RC   | 299 | 3,6 |
| Novembro | Sphoeroides testudineus | RC   | 589 | 4,2 |
|          | Micropogonia furnieri   | RC   | 260 | 3,4 |
|          | Sphoeroides testudineus | RL   | 203 | 3,1 |
|          | Sphoeroides testudineus | RL   | 186 | 1,9 |
|          | Stellifer rastrifer     | RL   | 66  | 3,1 |
|          | Nebris microps          | RO   | 85  | 16  |
|          | Micropogonia furnieri   | RC   | 106 | 19  |
| Dezembro | Nebris microps          | RC   | 129 | 21  |
|          | Sphoeroides testudineus | RL   | 104 | 1,3 |
|          | Nebris microps          | RL   | 272 | 19  |


Figura 4.14.: Relação entre metabólitos de PAHs totais (μg.g<sup>-1</sup> de bile) e as proteínas biliares totais (mg.mL<sup>-1</sup>) encontradas nos peixes da espécie *S. rastrifer* coletados na Baía de Santos. R<sup>2</sup>=0,71; p=0,07.



Figura 4.15.: Relação entre metabólitos de PAHs totais (μg.g<sup>-1</sup> de bile) e as proteínas biliares totais (mg.mL<sup>-1</sup>) encontradas nos peixes da espécie *M. furnieri* coletados na Baía de Santos. R<sup>2</sup>=0,071; p=0,886.



Figura 4.16.: Relação entre metabólitos de PAHs totais (µg.g<sup>-1</sup> de bile) e as proteínas biliares totais (mg.mL<sup>-1</sup>) encontradas nos peixes da espécie *N. microps* coletados na Baía de Santos. R<sup>2</sup>=0,37; p=0,47.



Figura 4.17.: Relação entre metabólitos de PAHs totais (µg.g<sup>-1</sup> de bile) e as proteínas biliares totais (mg.mL<sup>-1</sup>) encontradas nos peixes da espécie *S. testudineus* coletados na Baía de Santos. R<sup>2</sup>=0,94; p=0,004.

Somente a espécie *S. testudineus* apresentou correlação entre as duas variáveis. Para as demais espécies, as correlações mostraram que esta normalização não é uma boa ferramenta para ser aplicada às análises.

A maioria dos estudos de monitoramento realizados com metabólitos não apresenta correlações significativas entre estes e a concentração de proteína (International Council for the Exploration of the Sea, 2007). Silva *et al.* (2006) encontraram uma correlação positiva entre estas duas variáveis para as espécies *Porichthys porosissimus*, porém esta correlação não foi observada para *Prionotus nudigula* e *Cyclichthys spinosus*, sendo sugerida a apresentação tanto dos resultados normalizados quanto dos não normalizados para comparação. Kammann (2007), estudando a normalização em *Limanda limanda* e *Platichthys flesus*, encontrou baixa correlação entre a concentração de metabólitos de PAHs dos peixes analisados e as proteínas biliares.

Na tabela 4.4. estão apresentados os dados normalizados e nãonormalizados da espécie *S. testudineus*. Como houve uma correlação positiva entre estes (Figura 4.18), a normalização para esta espécie não vai promover uma variação significativa entre as razões dos resultados normalizados quando comparados com os não-normalizados. Richardson *et al.* (2004) e Vuorinem *et al.* (2006) também observaram que, quando a concentração de metabólitos é normalizada pelas proteínas, os resultados não variam muito, e as razões entre as concentrações de cada local continuam sendo próximas.

|                | não-normalizados | normalizados |
|----------------|------------------|--------------|
| S. testudineus | 143,39           | 68237,5      |
|                | 251,8            | 78383        |
|                | 298,5            | 84624,8      |
|                | 589,3            | 145363,9     |
|                | 203,78           | 68742,2      |
|                | 186,57           | 101176,9     |
|                | 103,5            | 8394,5       |

Tabela 4.4.: Resultados de metabólitos biliares totais não normalizados (μg.g<sup>-1</sup> de bile) e normalizados (μg.g<sup>-1</sup> de proteínas biliares) para a espécie *Sphoeroides testudineus*.



Figura 4.18.: Relação entre os resultados de metabólitos de PAHs biliares não normalizados (μg.g<sup>-1</sup> de bile) e normalizados (μg.g<sup>-1</sup> de proteínas biliares) para a espécie *S. testudineus* (R<sup>2</sup>>0,7 e P<0,05).

Dessa forma, para a Baía de Santos foi optado pela discussão usando os dados não-normalizados (µg.g<sup>-1</sup> de bile), facilitando na comparação dos valores para a espécie *S. testudineus* com os valores obtidos para *S. rastrifer*, *M. furnieri* e *N. microps*.

Da mesma forma, como a maioria dos trabalhos encontrados na literatura não emprega esta técnica (Ariese *et al.*, 1997; Escartin & Porte, 1999 a,b,c; Budzinski *et al*, 2004; Yang, 2004; Silva *et al.*, 2006; Johson-Restrepo, *et al.*, 2008) a apresentação dos resultados em µg. g<sup>-1</sup> de bile facilita na comparação dos valores de concentrações encontrados na Baía de Santos com os encontrados na literatura.

## 4.4. Variação da atividade EROD e dos níveis de metabólitos biliares nas espécies estudadas

Na Tabela 4.5. estão apresentados os resultados da atividade EROD (em pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína), de metabólitos de PAHs biliares totais (em  $\mu$ g.g<sup>-1</sup> de bile) e as correlações de Spearman entre estas variáveis para as espécies de peixes coletados em outubro e novembro de 2005 na Baía de Santos.

Os metabólitos biliares e a atividade EROD obtiveram correlação positiva (R<sup>2</sup>>0,75; p<0,05) para as espécies *S. rastrifer*, *M. furnieri* e *N. microps*. Para a espécie *S. testudineus* esta correlação não foi observada.

Tabela 4.5.: Atividade EROD (em pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína) e Metabólitos de PAHs totais biliares (em μg.g<sup>-1</sup> de bile) obtidos para *S. rastrifer, M. furnieri, N. microps* e *S. testudineus* analisados em outubro e novembro de 2005. R<sup>2</sup>= correlação de Spearman; p= nível de significância.

| Espécie                 | Atividade<br>EROD * | Metabólitos de<br>PAHs Totais ** | R <sup>2</sup> | р      |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------|----------------|--------|
|                         | 182                 | 436                              |                |        |
|                         | 254                 | 436                              |                |        |
| Stallifar reatrifar     | 262                 | 436                              |                |        |
| Stelliler Tastriler     | 37,2                | 65,5                             |                |        |
|                         | 37,2                | 65,5                             |                |        |
|                         | 71,6                | 190                              | 0,93           | 0,0001 |
|                         | 62,9                | 350                              |                |        |
|                         | 122                 | 399                              |                |        |
| Micropogonia furniari   | 129                 | 399                              |                |        |
| Micropogonia runnen     | 32,8                | 250                              |                |        |
|                         | 32,2                | 260                              |                |        |
|                         | 27,9                | 260                              | 0,79           | 0,006  |
|                         | 25,8                | 296                              |                |        |
|                         | 30,1                | 296                              |                |        |
| Nobris microps          | 26,2                | 235                              |                |        |
| Nebris microps          | 17,7                | 235                              |                |        |
|                         | 15,3                | 88,4                             |                |        |
|                         | 6,88                | 88,4                             | 0,84           | 0,003  |
|                         | 101                 | 589                              |                |        |
|                         | 59,3                | 143                              |                |        |
| Sphoeroides testudineus | 15,6                | 252                              |                |        |
|                         | 69,8                | 299                              |                |        |
|                         | 43,2                | 187                              | 0,60           | 0,28   |

\* Resultados individuais de cada organismo amostrado; \*\* Resultado baseado no agrupamento de indivíduos.

No geral, fatores que afetam o desempenho da atividade EROD afetam também a concentração dos metabólitos biliares, fazendo com que estes variem proporcionalmente (van Veld *et al.*, 1990; Whyte *et al.*, 2000). Porém,

diversos trabalhos encontraram falta de correlação entre os dois biomarcadores (Fuentes-Rios *et al.*, 2006; Inzunza *et al.*; 2006; Pikkarainen; 2006).

A ausência desta correlação para os *S. testudineus* da Baía de Santos pode ser devida diversos fatores. Esta espécie se diferencia das demais por ser representante da família dos Tetraodontidaes, enquanto que as outras três são representantes da família dos Sciaenidae, o que ocasiona uma diferenciação de metabolismo dos compostos. Além disso, a vesícula biliar do *S. testudineus* é visivelmente maior que a das outras espécies, havendo maior poder de estocagem dos metabólitos biliares antes de sua excreção. Assim, devido ao poder de acúmulo dos metabólitos ao longo do tempo, os resultados encontrados para estes são correspondentes a um período de exposição maior quando comparados com os valores de atividade EROD, que é associado a uma exposição mais recente.

Os valores de atividade EROD para as quatro espécies no presente estudo variaram de 6,88 a 262 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína com mediana de 37,2 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína e média de 72,2  $\pm$  72,5 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

No Golfo da Bothnia, na Finlândia, foram feitas duas amostragens para análise da atividade EROD em peixes da região: uma entre 6,5 e 8 meses após um derrame de petróleo (250 toneladas de petróleo) e outra 10 meses após o mesmo derrame. Os valores encontrados da atividade EROD foram, respectivamente, 60 e 10 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína para estes períodos, sendo estes resultados associados à presença de PAHs provindos do derrame (Lindstrom-Seppa, 1988). Pikkarainen (2006) observou que a atividade EROD em fêmeas de *Perca fluviatilis* do Mar Báltico, variou de 0,3 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, para os locais menos contaminados, a 13,7 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, para os mais contaminados, e relacionou os valores encontrados às concentrações elevadas de PAHs nestes ambientes. Estudo realizado por Ramsak et al. (2007), com Gobius niger coletados ao longo da costa da Eslovênia, apresentou valores que variaram de 38 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, na primavera (período de reprodução da espécie), em áreas não contaminadas, e valores que chegaram a 124 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína para áreas contaminadas. Já no inverno, os valores variaram de 49 a 166,7 pMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

Quando comparados às regiões da Bothnia e do Mar Báltico, os resultados da Baía de Santos apresentaram os mesmos níveis de concentração de atividade EROD encontradas em áreas contaminadas por PAHs. Já, quando comparados com os valores obtidos para a Eslovênia, a Baía de Santos apresentou a maioria de seus resultados com ordens de grandeza menores que os encontrados em áreas contaminadas dessa região.

A atividade EROD nos peixes tem relação com a temperatura ambiente (Galgani *et al.*, 1992). Como dito anteriormente, a maioria dos estudos encontrados na literatura foi feita em regiões temperadas, e a Baixada Santista possui um clima sub-tropical. É necessário cuidado quando se comparam duas regiões geograficamente distintas, já que nem sempre a atividade metabólica dos organismos amostrados nestas regiões será semelhante.

As diferenças interespecíficas no metabolismo dos PAHs também devem ser consideradas, já que as espécies usadas na literatura e as usadas na Baía de Santos não são as mesmas, o que pode dificultar a comparação entre elas.

Outro fator que pode afetar a atividade EROD é a presença de outros contaminantes no meio (Shalaija *et al.*, 2006). Compostos como PCBs, pesticidas, dioxinas/furanos, podem ocasionar um efeito sinérgico sobre as MFOs (Stegeman & Lech, 1991; Barra *et al.*, 2001; Inzunza *et al.*; 2006; Pikkarainen, 2006; Shalaija *et al*, 2006). A Baía de Santos é contaminada por outros compostos (Magalhães, 2005), o que pode estar mascarando os resultados da atividade EROD e dificultando a comparação dos valores encontrados na região com os resultados da literatura.

Mesmo assim, o uso concomitante da atividade EROD e dos metabólitos biliares como biomarcadores, e a forte correlação entre estes para a maioria das espécies usadas, faz com que a evidência da biodisponibilidade dos PAHs na Baía de Santos seja maior. Dessa forma a atividade EROD confirma os resultados obtidos de metabólitos biliares, mostrando que para a região, há presença de PAHs, sendo que, para a maioria dos indivíduos estudados, estes compostos estão biodisponíveis.

## 5. CONCLUSÕES

O método de análise de metabólitos de PAHs biliares através do uso do HPLC/F foi implementado, sendo feitas todas as adaptações necessárias para seu uso no LabQOM. Esta se mostrou uma técnica rápida e eficiente para avaliação da biodisponibilidade de PAHs.

A presença de metabólitos biliares nas amostras coletadas mostrou evidências da biodisponibilidade de PAHs na Baía de Santos para as espécies estudadas. Os resultados apresentaram ordem de grandeza próxima às regiões contaminadas e foram maiores que regiões sem introdução direta destes compstos.

Não houve diferenças significativas entre os metabólitos biliares totais e de NAF nas espécies estudadas (*Stellifer rastrifer, Micropogonia furnieri, Nebris microps* e *Sphoeroides testudineus*). A capacidade de locomoção dos indivíduos fez com que os níveis de metabólitos de FEN e BaP fossem menores para a espécie *N. microps*, espécie mais ativa, e maiores para a *S. testudineus*, espécie menos ativa. Concentrações intermediárias e sem diferença significativa foram encontradas para as espécies *S. rastrifer* e o *M. furnieri*.

Não houve diferenças nas concentrações de metabólitos entre os locais de coleta devido à mobilidade dos peixes estudados, indicando que a região onde estes são amostrados não corresponde necessariamente ao local onde houve a assimilação do PAH metabolizado.

Não houve diferenças significativas nas concentrações de metabólitos biliares em função dos meses coletados. Tal fato pode estar associado à alta variabilidade das amostras, já que indivíduos de diferentes sexo, estágio de maturação, etc; foram amostrados juntos.

Houve correlação entre metabólitos biliares e atividade EROD para *S. rastrifer*, *M. furnieri* e *N. microps*, porém não houve tal correlação para a *S. testudineus*.

A biodisponibilidade de PAHs observada na Baía de Santos através dos metabólitos biliares foi confirmada pela atividade EROD.

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYE, A. PAH in fish bile detected by fixed waveenght fluorescence. **Marine Enviromental Research**, v. 46, p. 225-228, 1998
- ABESSA, D. M. S. Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, São Paulo, Brasil. 2002. 290 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ACUÑA, A. A.; LORENZO, I.; LÓPEZ, M. Feeding habitats of the white croaker population (*Micropogonias furnieri*): ECOPLATA II PROJECT. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ECOPLATA, 1996, Montevideo.
  Abstracts ... Ottawa: IDRC, 1997. Disponível em: < <a href="http://www.idrc.ca/ev\_en.php?ID=25465\_201&ID2=DO\_TOPIC">http://www.idrc.ca/ev\_en.php?ID=25465\_201&ID2=DO\_TOPIC</a>>.
  Acesso em: 03 mar. 2008.
- ADDISON, R. F.; WILLIS, D. E.; ZINCK, M. E. Liver microsomal monooxygenase induction in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from gradient of sediment PAH concentration at Sydney Harbor, Nova Scotia. **Marine Enviromental Research**, v. 37, p. 283-296, 1994.
- ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R. Estudo da acumulação de hidrocarbonetos em mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758) na Baía de Santos. 2006. 45 f. Monografia – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALMEIDA, L. R. ; BRANCO, J. O. Aspectos biológicos e pesqueiros de Stellifer stellifer na pesca artesanal do camarão sete-barbas, na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 19, n. 2, p. 601-610, 2002.
- ALVES, D. R.; LUQUE, J. L. Community ecology of the metazoan parasites of white croaker, *Micropogoniass furnieri* (Osteichthyes: Sciaenidae), from

the coastal zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, n. 2, p. 145-153, 2001

- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Revista Brasileira de Epidemiolgia, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2003.
- ARIESE, F., KOK, S. J., VERKAIK, M., GOOIJER, C., VELTHORST, N. H.; HOFSTRAAT, J. W. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. <u>Aquatic toxicology</u>, v. 26, p. 273-286, 1993.
- ARIESE, F., BURGERS, H., OUDHUFF, K., RUTTEN, T., STROOMBERG, G., VETHAAK, D. Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring. Vrije Universiteit, Institute of Environmental Studies, 1997
- BAILEY, G. S.; GOEGER, D.; HENDRICKS, J. D. Factors influencing experimental carcinogenesis in laboratory fish models. In: VARANASI, U. (Ed.). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC, 1989. p. 253-268.
- BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. Ciência cultura, v. 45, p. 10 – 11, 1993.
- BAJPAI, R. K., S. K. UPADHYAY, JOSHI, B. S.; TRIPATHI, R. S. Productivity and economics of rice (*Oryza sativa* L.)-wheat (*Triticum aestivum* L.) cropping system under integrated nutrient supply systems. Indian Jounal of Agronomy, v. 47, p. 20-25, 2002.
- BALK, L.; MEIJE, J.; DEPIERRE, J.; APPELGREN, L.-E. The uptake and distribution of [<sup>3</sup>H]benzo(a)pyrene in the Northern pike (*Esox lucius*). Examination by whole-body autoradiography and scintillation counting.
   Toxicology applied to Pharmacology, v. 74, p. 430–449, 1986.

- BARRA, R.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; ORREGO, R.; PARRA, O.; GAVILÁN, J. F. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Onchorhynchus mykiss*. Chemosphere, v. 45, p. 439–444, 2001.
- BAUHLER, D. R.; WILLIAM, D. E. Enzymes involved in the metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: oxidative enzymes (or phase I enzymes). VARANASI, U. (Ed.). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC, 1989. p.151-184.
- BAUMANN, P. C.; SMITH, W. D.; RIBICK, M. Hepatic tumor rates and polynuclear aromatic hydrocarbon levels in two populations of brown bullhead (*Ictalurus nebulous*). In: COOKE, M.; DENNIS, A. J.; FISCHER, G. L. (Ed.) **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons**. Ohio: Battele, 1982. 93 p.
- BAUMANN, P. ; HARSHBARGER, J. Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. Environmental health perspect, v. 103, p. 168–170, 1995.
- \_\_\_\_\_. Long term trends in liver neoplasm epizootics of Brown Bullhead in the Black River, Ohio. Environmental monitoring assessment (Print), v. 53, p. 213.223, 1998.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; NARBONE, J. F.; BURGEOT, T.; MICHEL, X.; BELLOCQ, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. **Marine Enviromental Research**, v. 47, p. 415-439, 1998.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKY, H.; GARRIGUES, P.; DIZER, H.; HANSEN, P. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediment and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability

and seasonal variations. **Marine Enviromental Research**, v. 47, p. 17-47, 1999.

- BENOLIEL, M. J. Pesticidas organoclorados e policlorobifenis em mexilhao na costa portugesa: Mussel Watch'. Anais Instituto de Hidrográfico, v. 7, p. 71–77, 1986.
- BEYER, J.; SANDVIK, M.; HYLLAND, K.; FJELD, E.; EGAAS, E.; AAS, E.; SKARE, J. U.; GOKSOYR, A. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. Aquatic toxicology, v. 36, p. 75–98, 1996.
- BEYER, J.; SANDVIK, M; SKARE, J; EGAAS, E; HYLLAND, K; WAAGBØ, R; GOKSOYR, A. Time- and dose-dependent responses of flounder (*Platichythys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4,4',5hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. **Biomarkers**, v. 2, p. 35-44, 1997.
- BLACK, J. J. Field and Laboratory studies of environmental carcinogenesis in Niagara River fish. Journal of Great Lakes Researches, v. 9, p. 326-334, 1983.
- BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). **Oceanologic acta**, v. 16, n. 2, p. 145-161, 1993.
- BRITVIC, S.; LUCIC, D.; KURELEC, B. Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics.
   Environmental toxicology and chemestry, v. 12, p. 765-773, 1993.
- BRUMLEY, C. M.; HARITOS, V. S.; AHOKAS, J. T.; HOLDWAY, D.A. The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: implications for biomonitoring. Ecotoxicological and Environmental Safety, v. 39, p. 147-153, 1998.

BUDZINSKI, A.; MAZÉAS, O.; TRONCZYNSKI, J,; DÉSAUNAY, Y.;
BOCQUENÉ, G.; CLAIREAUX, G. Link between exposure of fish (Solea solea) to PAHs and metabolites: Application to the "Erika" oil spill.
Aquatic Living Resource, v. 17, p. 329–334, 2004.

CARVALHO-FILHO, A. Peixes: costa brasileira. São Paulo: Melro, 1992

- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. (Relatório Técnico CETESB). São Paulo: CETESB, 2001.
- CHAVES, P. T. C.; VENDEL, A. L. Reprodução de Stellifer rastrifer (Jordan) (Teleostei, Sciaenidae) na Baía e Guaratuba, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 14, n. 1, p. 81-89, 1997.
- CHIAVERINI, A. P. Ecologia trófica de Sphoeroides testudineus Linnaeus,
   1758 e Sphoeroides greeleyi Gilbert, 1900 da Gamboa do Perequê,
   Pontal do Sul, Paraná, Brasil. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CLARK, R. B. Marine pollution. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Clarendon, 1997.
- COELHO, J. A. P.; GRAÇA-LOPES, R.; RODRIGUES, E. S.; PUZZI, A. Relação peso-comprimento e tamanho de início de primeira maturação gonadal para o sciaenidae *Stellifer rastrifer* (JORDAN, 1989), no litoral do Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 2, p. 100-107, 1985.
- COLLIER, T. K. ; VARANASI, U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophyrs vetulus*) exposed to environmental contaminants. **Archives of environmnetal contamination and toxicology**, v. 20, p. 462-473, 1991.
- COLLIER, T. K.; KRONE, C. A.; KRAHN, M. M.; STEIN, J. E.; CHAN, S.-L; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects

in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. American Fisheries Society. Symposium, v. 18, p. 671-683, 1996.

- COLOMBO, J. C.; PELLETIER, E.; BROCHU, C.; KHALIL, M.; CATOGGIO, J.
  A. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata estuary, Argentina. Environmenatal Science & Technology, v. 23, n. 7, p. 888-894, 1989.
- COUSSEAU, M. B.; PERROTA, R. Peces marinos de Argentina. Biologia, distribuición, pesca. Mar del Plata: INIDEP, 1998.
- CRISPINO, R. P. Caracterização ecomorfológica de algumas espécies da ictiofauna do complexo estuarino-lagunar de Iguape-Cananéia,
   São Paulo, Brasil. 2001, 218 f. Tese (Doutorado) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DEN BESTEN, P. J.; ELENBAAS, J. M. L.; MAAS, J. R.; DIELEMAN, S. J.; HERWIG, H. J.; VOOGT, P. A. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L, **Aquatic Toxicology**, v. 20, p. 95–110, 1991.
- EGGENS, M. L.; OPPERHUIZEN, A.; BOON, J. P. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. **Chemosphere**, v. 33, n. 8, p. 1579-1596, 1996.
- EISLER, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service, 1987. (Contaminant Hazard Reviews Report, 11).
- EMPRESA DE PORTOS DO BRASIL. Comportamento hidráulico e sedimentológico do estuário Santista: relatório final. [S.I.]: Sondotecnica, 1977. (Sondotecnica, 1977)

- ESCARTÍN, E.; PORTE, C. Biomonitoring of PAH Pollution in High-Altitude Mountain Lakes through the Analysis of Fish Bile. **Evironmental Science & Technology**, v. 33, p. 406-409, 1999a.
- \_\_\_\_\_. Assessment of PAH on coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 1200-1206, 1999b.
- \_\_\_\_\_. Hydroxylated PAHs in bile of deep-sea fish: relationship with xenobiótico metabolizing enzymes. Environmental Science &Technology, v. 33, n. 2710-2714, 1999c.
- FENT, K.; BÄTSCHER, R. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. Environmental toxicology and chemistry, v, 19, n. 8, p. 2047–2058, 1999.
- FERNÁNDEZ, M.; SICRE, M.; BOIREAU, A.; TROCZYNSKI, J. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. Marine Pollution Bulletin, v. 34, p. 857–867, 1997.
- FIGUEIREDO, J. L. ; MENEZES, N. A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil VI: teleostei, 5. São Paulo: Museu de Zoologia, 2000.
- FÖRLIN, L., ANDERSSON, T., BENGTSSON, B. E., HÄRDIG, J. ; LARSSON, Å., Effects of pulp bleached plant effluents on hepatic xenobiotic biotransfromation enzymes in fish: laboratory and field studies. Marine Enviromental Research, v. 17, p. 109–112, 1985.
- FOUREMAN, G.L. Enzymes involved in the metabolismo f PAH by fishes and other aquatic animals: hydrolysis conjugation (or phase II enzimes). In: VARANISI U. (Ed.). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC, 1989. p. 185-202.

- FRANCIONI, E.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L.; DEPLEDGE, M. H.; CAVALIER, B. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 329–338, 2007.
- FRYER, H. J. L.; DAVIS, G. E.; MANTHRORPE, M.; VARON, S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. Analytical biochemistry, v. 153, p. 262–266, 1986.
- FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. Chemosphere, v. 61, n. 2, p. 192-199, 2006.
- FUKUMOTO, M. M. Determinação da história deposicional recente do Alto Estuário Santista, com base nos teores de metais e na suscetibilidade magnética dos sedimentos. 2007. 134 f. Tese de doutorado - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FÚLFARO, V. J. ; PONÇANO, W. L. Sedimentação atual do estuário e Baía de Santos: um modelo geológico. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE GEOLOGIA DE ENGENHARIA, 1., Rio de Janeiro.
  Anais ... São Paulo: ABGE, 1976. v. 2, p. 67-90.
- GALGANI, F.; BOCQUÉNÉ, G.; TRUQUET, P.; BURGEOT, T.; CHIFFOLEAU, J.-F.; CLAISSE, D. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts. Oceanologica Acta, v. 15, p. 355–364, 1992
- GEARING, P. J.; GEARING, J. N.; PRUELL, R. J.; WADE, T. L.; QUINN, J. G.
  Partioning of nº. 2 fuel oil in controlled estuarine ecosystems, sediments and suspended particulate matter. Environmental Science & Technology, v. 14, p. 1129-1136, 1980.

- GEWURTZ, S; LAZAR, R.; HAFFNER, D. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl dynamics in benthic invertebrates of Lake Erie, USA. Environmental toxicology and chemistry, v. 19, p. 2943–2950, 2000.
- GIESSING, A. M. B.; MAYER, L. M.; FORBES, T. L. Synchronous Fluorescence Spectrometry of 1-hydroxipyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. Marine environmental research, v. 56, p. 599-615, 2003.
- GODOY, M. P. Fishes of Santa Catarina State. Florianópolis: Ed. UFSC, 1987. p. 298-299.
- GOMES, I. D. A estrutura da ictiofauna demersal do Paraná, entre os sistemas de Baía de Guaratuba e a foz do Rio Saí-Guaçu. 2004. 127
   f. Tese (Doutorado) Universidade Federal da Paraná, Curitiba.
- HAIMOVICI, M.; CASTELLO, J. P; VOOREN, C. M. Fisheries. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. (Ed.), Subtropical convergence environments, the coast and sea in the Southwestern Atlantic. Heidelberg: Springer Verlag, 1997. p. 56-91.
- HARARI, J.; MESQUITA, A. R.; MARONE, E.; FRANÇA, C. A. S.; CAMARGO,
  R.; PEREIRA, J. E. R.; ADÃO, C. J. G. P.; SÁ JUNIOR, I. L. 1990.
  Technical report of the Project Flow measurements in the Bay of Santos. FUNDESPA. São Paulo, 56 p.
- HINTON. D. E.; BAUMAN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. (Ed.). Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis, 1992. p. 155-209.
- HODSON, P. V.; KLOEPPER-SAMS, P. J.; MUNKITTRICK, K. R.; LOCKHART, W. L.; METNER, D. A.; LUXON, P. L.; SMITH, I. R.; GAGNON, M. M.;

SERVOS, M.; PAYNE, J. F. Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. **Canadina technical report of fisheries and aquatic science**, n. 1829, 1991.

- HODSON, P. V.; SHERRY, J.; PARROTT, J. Bioassays to measure MFO inducers in effluents. In: WELLS, P.G., LEE, K., BLAISE, C. (Ed.).
  Microscale Testing in Aquatic Toxicology, Advances, Techniques, and Practice. Florida: CRC, 1998. p. 53-76.
- HUGGETT, R. J.; STEGEMAN, J. J.; PAGE, D. S.; PARKER, K. R.; WOODIN, B.; BROWN, J. S. Biomarkers in fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska. Environmental Science & Technology, v. 37, p. 4043-4051, 2003.
- HYLLAND, K.; SANDVIK, M.; SKARE, U.; BEYER, J.; EGAAS, E.; GOKSOYR,
  A. Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring. Marine Environmental Research, v. 42, p. 223–227, 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2008. Estimativa da população residente em 01.07.2006, segundo os municípios. www.ibge.gov.br. Disponível em: <>. Acesso em: 24 abr. 2008.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH IN CANCER. Polynuclear aromatic hydrocarbons part 1: chemical environmental and experimental data. Lyon: IARC, 1983. p. 95-451. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 32) <u>IARC monogr.</u> eval. carcinog. risk chem. hum.

## INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA. **Report** of the study group on baltic ecosystem health. Tallinn: ICES, 2007.

INZUNZA,B; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 65, p. 242-251, 2006.

- ISHIKAWA-FERREIRA, L. Estudo dos baiacus da região estuarina-lagunar de Cananéia. 1994. 158 p. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- JOHNSON, L. L.; LANDAHL, J. T.; KUBIN, L. A.; HORNESS, B. H.; MYERS, M. S.; COLLIER, T. K.; STEIN, J. E. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations, Journal of Sea Research, v. 39, p. 125–137, 1998.
- JOHSON-RESTREPO, B.; OLIVERO-VERBEL, J.; LU, S.; GUETTE-FERNÁNDEZ, J.; BALDIRIS-AVILA, R.; O'BYRNE-HOYOS, I.; ALDOUS, K. M.; ADDINNK, R.; KANNAN, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. Environmental Pollution, v. 151, p. 452-459, 2008.
- KAMMANN, U. PAH metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and Flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal change.
   Environmental Science Pollution Researches, v. 14, n. 2, p.102-108, 2007.
- KIRBY, M. F.; NEALL, P.; TYLOR, T. EROD activity measured in flatfish from the area of the Sea Empress oil spill. Chemosphere, v. 38, p. 2929-2949, 1999.
- KRAHN, M. M.; MEYERS, M. S.; BURROWS, D. G.; MALINS, D. C. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. Xenobiotica, v. 14, p. 633-646, 1984.
- KRAHN, M. M.; RHODES, L. D.; MEYERS, M.S.; MOORE, L. K.; MACLEOD JR, W. D.; MALINS, D. C. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington.

**Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 15, p. 61–67, 1986.

- KRAHN, M. M.; BURROWS, D. G.; MACLEOD JR.; W. D.; MALINS, D. M. Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolyzed bile of English sole (*Parophrys vetulus*) from polluted sites in Puget Sound, Washington, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 16, p. 511–522, 1987.
- KRAHN, M. M., BURROWS, D. G., YLITALO, G. M., BROWN, D. W., WIGREN,
  C. A., COLLIER, T. K., CHAN, S.-L.; VARANASI, U. Mass spectrometric determination of metabolites of aromatic compounds in bite of fish captured from Prince William Sound, Alaska, after the *EXXON Valdez* oil spill. Environmental Science & Technology, v. 26, p. 116-126, 1992.
- KRAHN, M. M.; YLITALO, G. M.; BUZITIS, J.; BOLTON, J. L.; WIGREN, C. A.;
  CHAN, S. L.; VARANASI, U. Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the gulf oil spill.
  Marine Pollution Bulletin, v. 27, p. 285-292, 1993.
- LARSEN, J. C. Levels of pollutants and their metabolites: exposures to organic substances. **Toxicology**, v. 101, p. 11-27, 1995.
- LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 29, p. 235-241, 1994.
- LEE, R. F. ; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. Marine Pollution Bulletin, v. 50, p. 705-723, 2005.
- LEVIN, W.; WOOD, A. W.; WISLOCKI, P. G.; CHANG, R. L.; KAPITULNIK, J.; MAH, H. D.; YAGI, H.; JERINA, D. M.; CONNEY, A. H. Mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene derivatives.

In: GELBONI, H.V.; TS'O, P.O. (Ed.). **Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer**: environment, chemistry, and metabolism. New York: Academic, 1978. p. 189 -202.

- LIN, E. L. C.; CORMIER, S. M.; TORSELLA, J. A. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 35, p. 16–23, 1996.
- LIN, G. F., MA, Q. W., CHEN, J. G., SHEN, J. H., XIANG, C. Q., GOLKA, K.; ZHANG, D. S. Dependence of Papanicolaou gradings of exfoliated urothelial cells upon GSTM1 and GSTT1 polymorphism in benzidineexposed workers of the Shanghai dye industry. Archives of Toxicology, v. 75, p. 544–548, 2001.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCENA, C. A. S. ; LUCENA, Z. M. S. Catálogos dos peixes marinhos do museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Teleosteni (Final). Comunicado do Museu de Ciência PUC RGS, v. 25, p. 1-80, 1982.
- MAGALHÃES, C. A. PCBs e Pesticidas Organoclorados em tecidos de peixes da Baixada de Santos, São Paulo. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MARCELLINO, E. B. Sistematização dos projetos de emissários submarinos da SABESP e avaliação de desempenho através do modelo computacional CORMIX. 2000. 196 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MARTINS, C. C. Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um

registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho. 2005. 272 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- MATOS, M. A. C. Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sediementos e algas de Santos e Cananéia, SP, Brasil. 2002. 201 f. Tese (Doutorado) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MCCAIN, B. B.; MALINS, D. C.; KRAHN, M. M.; BROWN, D. W.; GRONLUND,
  W. D.; MOORE, L. K.; CHAN, S. L. Uptake of aromatic and chlorinated hydrocarbons by juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in an urban estuary. Archives of environmental contamination and toxicology, v. 19, p.10-16, 1990.
- MCELROY, A. E.; FARRINGTON, J. W.; TEAL, J. M. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Ed.). Metabolism of Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC: 1993. p.1-40.
- MEADOR, J. P.; SOMMERS, F. C.; YLITALO, G. M.; SLOAN, C. A. Altered growth and physiological responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytshca*) from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic, v. 63, p. 2364–2376, 2006
- MEADOR, J. P.; BUZITIS, J.; BRAVO, C. F. Using Fluorescent Aromtic Compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 27, n. 4, p. 845–853, 2008.
- MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers: I. Santos, SP – Brazil. Marine Pollution Bulletin, v. 49, p. 761-769, 2004a.

- \_\_\_\_\_. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers: II. São Sebastião, SP Brazil. Marine Pollution Bulletin, v. 49, p. 892-899, 2004b.
- MENSÁRIO ESTATÍSTICO. Santos: CODESP, jan. Disponível em <<u>http://www.portodesantos.com.br/down/2008-01.pdf</u>>. Acesso em 24 abr. 2008a.
- MENSÁRIO ESTATÍSTICO. Santos: CODESP, fev. Disponível em: <<u>http://www.portodesantos.com.br/down/2008-02.pdf</u>>.Acesso: 24 abr. 2008b.
- MICROPOGONIA furnieri. In: FI**SH BASE**. [2008]. Disponível em: <<u>http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=7620&ge</u> <u>nusname=Micropogonias&speciesname=furnieri</u>>. Acesso em: 03 mar. 2008.
- MIX, M. C. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review, Marine Environmental Research, v. 20, p. 1–141, 1986.
- MOSER, G. A. O. Aspectos da eutrofização no Sistema Estuarino de São Vicente-Santos: distribuição espaço temporal da biomassa e produtividade primária fitoplânctonica e transporte instantâneo de sal, clorofila-a, material em suspensão e nutrientes. 2002. 227 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL UNITED STATES (NRC-US). Oil in the sea: inputs, fates and effects. Wasihngton, D.C.: National Academy Press, 1985.
- NEBRIS microps. In: FISH BASE. [2008]. Disponível em:<<u>http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=1184</u> >. Acesso em: 03 mar. 2008.

- NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: source, fates and biological effects. London: Applied Science, 1979.
- OCCHIPINTI, A. G. Estudos para o sistema de disposição oceânica dos esgotos de Santos e São Vicente. Revista. D.A.E., v. 32, n. 86, p. 155-176, 1972.
- OCCHIPINTI, A. G. Estado da poluição das praias de Santos e Plano de Saneamento de estuário santista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA, 8., 1975, Rio de Janeiro. Anais ... Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria, 1975.
- PAIVA-FILHO, A. M. ; SCHIMIEGELOW, J. M. M. Estudo sobre a ictiofauna acompanhante da pesca so camarão sete-barbas, *Xyphopenaes kroyeri*, nas proximidades da Baía de Santos, SP. Boletim do Instituto Oceanográfico, v. 34, p. 79-85, 1986.
- PAIVA-FILHO, A. M. ; CERGOLE, M. C. Diferenciação geográfica de Nebris microps (Cuvier, 1830) na costa sudeste do Brasil. Boletim do Instituto Oceanográfico, v. 36, n. 1/2, p. 37-45, 1989.
- PAYNE, J. F. Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In: PERSONNE, G.; JASPERS, E.; CLAUS, C. (Ed.). Ecotoxicological testing for the marine environment. Bredene – Belgium: State University Ghent and Institute of Marine Scientific Research, 1984. p. 625–655.
- PERES-RIOS, E. Papel do estuário no ciclo de vida das espécies dominantes da ictiofauna do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape. 2001. 128 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PIKKARAINEN, A. L. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC, **Chemosphere**, v. 65, p. 1888–1897, 2006.

- PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. Archives Environmental Contamination and Toxicology, v. 26, p. 273-281, 1993.
- POWER, D. A. Fish as models systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.
- RAMSAK, A., STOPAR, K., SEPCIC, K., BERDEN-ZRIMEC, M., BAJT, O., MALEJ, A. Reflection of hydrocarbon pollution on hepatic EROD activity in the black goby (*Gobius niger*), Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 24, n. 3, p. 304-310, 2007.
- RIBEIRO-NETO, F. B. Estudo da comunidade de peixes da Baía de Santo,
   SP. 1989. 196 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Oceanográfico,
   Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RICHARDSON, D. M.; DAVIES, L. M.; MOFFAT, C. F.; POLLARD, P.; STAGG,
  R. M. Biliary PAH metabolites and EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) from a contaminated estuarine environment.
  Journal of Environmental Monitoring, v. 3, p. 610-615, 2001.
- RICHARDSON, D. M., GUBBINS, M. J., DAVIES, I. M., MOFFAT, C. F.; POLLARD, P. M. Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*). Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 17, p. 79-85, 2004.
- RODRIGUES, M. H. C. Unha como biomarcador de exposição subcrônica ao flúor a partir do dentifrício fluoretado em crianças de 2 - 3 anos.
   2003. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- ROTCHELL, J. M.; BIRD, D. J.; NEWTON, L. C. Seasonal variation in ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in European eels Anguilla anguilla and flounders Pleuronectes flesus from the Severn

estuary and Bristol channel. **Marine Ecology Progress Series**, v. 190, p. 263–270, 1999.

- RUDDOCK, P. J. BIRD, D. J.; McCALLEY, D. V. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary.
   Ecotoxicology and environmental safety, v. 51, p. 97-105, 2002.
- SÃO PAULO. Secretaria de Economia e Planejamento. Perfil regional: região metropolitana da Baixada Santista. São Paulo, 2007. Disponível em: <<u>http://www.planejamento.sp.gov.br/des/textos8/RMBS.pdf</u>>. Acesso em: 21 nov. 2007.
- SEAPORTS OF SOUTH AMÉRICA (SSA). 1999. Disponível em: www.seaporinfo.com. Acesso em: 05 out 1999.
- SHALAIJA, M. S.; RAJAMANICKMAM,R.; WAHIDULLA, S. Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite. Environmental Pollution, v. 143, p. 174-177, 2006.
- SILVA, D. A. M.; BUZITIS, J.; KRAHN, M. M.; BÍCEGO, M. C.; PIRES-VANIN, A. M. S. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. Marine Pollution Bulletin, v. 52, n. 12, p. 1804-1816, 2006.
- SLOAN, C. A.; BROWN, D. W.; YLITALO, G. M.; BUZITIS, J.; HERMAN, D. P.;
  BURROWS, D. G.; TANAGIDA, G.; PEARCE, R. W.; BOLTON, J. L.; BOYER,
  R. H.; KRAHN, M. M. Quality assurance plan for analyses of environmental samples for polycyclic aromatic compounds, persistent organic pollutants, fatty acids, stable isotope ratios, lipid classes, and metabolites of polycyclic aromatic compounds. NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC, n. 77, 2006.
- SMITH, S. B; BLOUIN, M. A.; MAC, M. J. Ecological comparisons of Lake Erie tributaries with elevated incidence of fish tumors. Journal of Great Lakes Research, v. 20, p. 701–716, 1994.

- SORIANO, J. A.; VINAS, L.; FRANCO, M. A.; GONZÁLES, J. J.; ORTIZ, L.; BAYONA, J. M.; ALBAIGÉS, J. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by *Prestige* oil Spill. Science of the Total Environment, v. 370, p. 80-90, 2006.
- SPHOEROIDES testudineus. In: **FISH BASE**. [2008]. Disponível em: < <u>http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=1242</u>>. Acesso em: 03 mar. 2008.
- STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochorme p-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen pollutant exposure. Environmental Health Perspective, v. 90, p. 101-10, 1991.
- STEGEMAN, J. J. ; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxigenase: Currents perspectives on forms, functions and regulations of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALLINS, D. D.; OSTRANDER, G. K. (Ed.). Aquatic Toxicology. Florida: Lewis, 1994. p.87-206.
- STEIN, J. E.; HOM, T.; CASILLAS, E.; FRIEDMAN, A. J.; VARANASI, U. Simultaneous exposure of English sole (*Parophrys vetulus*) to sediment-associated xenobiotics. Part 2. Chronic exposure to an urban estuarine sediment with added <sup>3</sup>H-benzo(a)pyrene and <sup>14</sup>Cpolychlorinated biphenyls. **Marine Environmental Research**, v. 22, p. 123–149, 1987.
- STELLIFER rastrifer. In: **FISH BASE**. [2008]. Disponível em: <<u>http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=1196</u>>. Acesso em: 03 mar. 2008.
- STROOMBERG, G. J.; DE KNECHT, J. A.; ARIESE, F.; VAN GESTEL, C. A. M.; VELTHORST, N. H. Pyrene metabolites in the hepatopancreas and gut of the isopod *Porcellio Scaber*, a new biomarker for polycyclic

aromatic hydrocarbon exposure in terrestrial ecosystems. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 18, p. 2217–2224, 1999.

- TOMMASI, L. R. Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP). 1979. 489 f. Tese (Livre docência) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- UNEP/IOC/IAEA/FAO. Contaminant monitoring programme using marine organism: quality assurance and good laboratory practice. Nairobi: UNEP, 1989. (Reference methods for marine pollutions studies, n. 57).
- UPSHALL, C.; PAYNE, J. F.; HELLOU, J. Induction of MFO enzymes and production of bile metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to waste crankcase oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2105-2112, 1993.
- VAN DER OOST, R.; VAN SCHOOTEN, F.; ARIESE, F. J; HEIDA, H.; SATUMALAY, K.; VREMEULEN, N. P. E. Bioacumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: A field survey. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 13, p. 859-870, 1994.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.
   Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VAN VELD, P. A.; WESTBROOK, D. J.; WOODIN, B. R.; HALE, R. C.; SMITYH, C. L. HUGGET, R. J.; STEGEMAN, J. J. Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leistomus xanthurus*) from polycyclic aromatic hydrocarbons contamined environment. Aquatic Toxicology, v. 17, p. 119-132, 1990.
- VARANASI, U.; STEIN, J. E.; NISHIMOTO, M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: VARANASI, U. (Ed.). Metabolism of

polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC, 1989. p. 93-150.

- VAZZOLER, A. E. A. M. Síntese de conhecimento sobre a biologia da corvina, Micropogoniass furnieri (Desmarest, 1823), da costa do Brasil.
   Atlântica, v. 13, p. 55-74, 1991.
- VUORINEN, P. K.; KEINÄNEN, M.; VUONTISJÄRVI, H.; BARŠIENĖ, J;
  BROEG, J.; FÖRLIN, L.; GERCKEN, J.; KOPECKA, J.; KÖHLER, A.;
  PARKKONEN, J.; PEMPKOWIAK, J.; SCHIEDEK, D. Use of biliary
  PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea.
  Marine Pollution Bulletin, v. 53, n. 8-9, p. 479-487, 2006.
- WANG, Z.; FINGAS, M. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in soils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. Journal of Chromatography A, v. 774, p. 51-78, 1997.
- WANG, Z.; FINGAS, M.; PAGE, D. S. Oil spill identification. Journal of Chromatography A, v. 834, p. 369-411, 1999.
- WEBSTER, L.; ANGUS, L.; TOPPING, G.; DALGARNO, E. J.; MOFAT, C. F. 1997. Long-term monitoring of Polyciclic Aromatic Hydrocarbons in mussel (*Mytilus edulis*) following the Braer Oil Spill. **The Analyst**, v. 122, p. 1491-1495, 1997.
- WHYTE, J. J.; JUNG, R. E.; SCHMITT, C. J. J.; TILLITT, D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Critical Reviews in Toxicology, v. 30, p. 347-570, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Biomarkers and risk assessment**: concepts and principles. Geneva: WHO, 1993. (Environmental Health Criteria, 155).

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biological monitoring of chemical exposure in the workplace**: occupational health for all. Geneva: WHO; 1996. 2 v.
- YANG, M.S.X. Use of fish biomarkers to assess the contaminant exposure and effects in Lake Erie tributaries. 2004. 168 f. Tese (Doutorado) -Environmental Science Graduate Program, Ohio State University, Ohio.
- YU, Y.; WADE, T. L.; FRANG, J.; MCDONALD, S.; BROOKS, J. M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in Antarctic fish (*Notothenia gibberifrons*) injected with diesel fuel arctic. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 29, p. 241-246, 1995.
- ZAVALA-CAMIN, L. A. Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes. Maringá: EDUEM. 1996.