INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DE SIRIS DA ESPÉCIE *Callinectes danae* COMO
BIOMONITORES DEFINITIVOS NA IDENTIFICAÇÃO DE FONTES EMISSORAS**

ISABELLA CRISTINA DA COSTA LEAL BORDON

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza
Sarkis

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

SÃO PAULO

2014

Agradecimentos

Em muitos momentos, duvidei que conseguiria concluir esta tese. As dificuldades foram imensas, mas a fé, o apoio e a participação da família, amigos e colegas de área foram INDISCUTIVELMENTE o combustível que me moveu e que permitiu a conclusão deste documento.

Primeiramente, agradeço a Deus e ao Cristo por me permitirem a vida.

À Yemanjá yê, querida Rainha do mar, por me permitir conhecer (mesmo que uma parte ínfima) o ambiente marinho, tão complexo, profundo e sagrado! ODOIÁ!

Ao Prof. Dr. Jorge Sarkis, meu orientador, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Caracterização Isotópica, o que permitiu a condução e conclusão deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

Ao meu marido, Pedro, pelo amor, pela imensa paciência e por sua presença nas horas mais difíceis, que exigiram que alguém estivesse mais centrado que eu para me incentivar a seguir até o fim.

Aos meus pais, Anne e Abinael, e à Maluzinha, por tudo que vivemos até agora, e por estarem presentes em todas as horas, fossem elas alegres ou tristes.

Aos meus sogros, Antonia e André, e aos meus cunhados, por todo amor que dispensaram durante este período de luta.

Ao Dr. Afonso Aquino, que tanto me ajudou nesta fase importante da minha vida, com conselhos, suporte emocional e científico.

Ao MSc. Gustavo Maluf Gobatto, amigo que me deu suporte emocional quando minha família não pode me assistir durante este doutoramento. Caro amigo: conte comigo sempre, até mesmo em coleta de sedimento próxima ao emissário de Santos, durante uma tempestade, sem colete salva-vidas (risos).

Às minhas meninas, Mariana Lima e Nathália Andrade: MUITO, MUITO, MUITOOOOOOOOOOOOOOOOO OBRIGADA!!! CONTEM COMIGO!!!

À MSc. Luciana Vieira, queridíssima amiga, pelo seu milagroso ouvido e pela amizade maravilhosa.

Aos amigos de sala, futuros Dr. Ernesto Diaz e Dr. Cristina Zampieri, pelas conversas, risadas, polêmicas, enfim, pela valiosíssima amizade.

Aos MSc. "Rafaeis" Pestana e Marin, pelas piadas e risadas nas horas de maior estresse.

À MSc. Marta da Silva e à Prof^a Marcia da Silva, pela amizade e pela preocupação com meus estudos.

À Dra. Carolina Joerges, pelo apoio psicoemocional e pela valiosa amizade.

Ao técnico Luiz Evangelista, meu amigo, que foi o primeiro a auxiliar o piloto deste trabalho.

Ao Dr. João Ulrich, O HOMEM DA QUALIDADE, que muito me ajudou com suas conversas, conselhos e puxões de orelha.

Ao MSc. Marcos Hortellani, pela sua cooperação e paciência nas análises no Absorção Atômica.

Ao Dr. Acácio Tomás e ao MSc. Allan Scalco, meus amigos, que me apoiaram nas coletas em campo. Não há o que pague o esforço físico que vocês fizeram por este trabalho.

Aos estagiários do Dr. Acácio: Silmara, Raphael, Tomás, Carla e outros que já não estão mais estagiando e que muito me auxiliaram na triagem do material.

Ao Seu Jackson, meu barqueiro número 1, que me acompanha em coletas desde 2005.

À Dona Marta e ao Seu Luiz, pelo cafezinho das 9:00h e pelas palavras de conforto e apoio.

Às meninas da equipe de limpeza do CLA, principalmente à Verinha e à Antônia, pelo carinho.

Ao Dr. Denis Abessa, Dra. Tânia Márcia Costa e ao Dr. Ronaldo Christofolletti, que prontamente se dispuseram a me auxiliar durante esta etapa, em diversas ocasiões.

À Dra. Cláudia Maris, Dra. Deborah Fávaro e ao Dr. José Oscar Vega Bustillos, que confiaram a mim o trabalho de alguns de seus alunos. Muitas vezes, foi a confiança deles no meu trabalho que me incentivou a seguir e confiar em mim mesma.

À Dra. Patrícia Teixeira, Dra. Fernanda Menezes e à Dra. Danielle Dias: MUITO OBRIGADA, AMIGAS!

À Adriane Tempest e ao Dr. Roberto Borges, do Ministério Público do Estado de São Paulo, que muito me ajudaram com informações e conselhos.

À queridíssima futura Dra. Ana Carolina Mazzuco, por todos esses anos de amizade e pelo auxílio na estatística.

À futura Dra. Larissa Pereira, veterana que me escutou durante alguns almoços, nos momentos mais críticos.

À Dra. Marycel Cotrim e ao técnico Maurício Kakazu, do CQMA, que me auxiliaram na conduta das últimas análises.

À Dra. Ágata Romero, pela ajuda com os mapas e pelo companheirismo via email (risos).

À Dra. Rachel Hauser Davis, pela ajuda nos últimos minutos da prorrogação deste doutoramento (risos).

Ao Sr. Mauro Cerdeira e Sra. Adriana, que foram peças-chave para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos de sempre: Tatiane, Fernando, Samira, Família Figueiredo, Felipe, Anselmo, Aline, Ludmila, Johnny, Keiko, Pitú, João Carlos, Mônica, Walter, Eliane. Aos meus tios e primos das famílias ANTUNES DA COSTA e BORDON.

Foram tantas pessoas que me auxiliaram neste processo que é possível que eu tenha esquecido algum nome. De forma a preencher esta lacuna, declaro aqui meu sentimento de gratidão por todos que, de alguma forma, se sintam parte deste trabalho.

"Enquanto os rios correrem para o mar, os montes fizerem sombra aos vales e as estrelas fulgirem no firmamento, deve durar a recordação do benefício recebido na mente do homem reconhecido." Virgílio

*“Lembraí do tempo que levastes para chegar aqui, de todas as vitórias e lágrimas,
de todos os sorrisos e fracassos.*

Lembraí dos sonhos realizados, das frustrações, das decepções colhidas.

Lembraí de tudo o que passou.

*Ganhastes mais força, mais sabedoria e finalmente podes olhar para o que há
diante de ti e perceber que apenas chegastes ao começo.*

– Seja bem vindo ao começo!”

Augusto Branco

“Peço-te o prazer legítimo e o movimento preciso

Tempo tempo tempo tempo

Quando o tempo for propício

Tempo tempo tempo tempo...

De modo que o meu espírito ganhe um brilho definido

Tempo tempo tempo tempo

E eu espalhe benefícios

Tempo tempo tempo tempo...

O que usaremos prá isso fica guardado em sigilo

Tempo tempo tempo tempo

Apenas contigo e comigo

Tempo tempo tempo tempo...”

Caetano Veloso

AVALIAÇÃO DE SIRIS DA ESPÉCIE *Callinectes danae* COMO BIOMONITORES DEFINITIVOS NA IDENTIFICAÇÃO DE FONTES EMISSORAS

Isabella Cristina da Costa Leal Bordon

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma nova proposta de uso de um biomonitor na identificação de fontes emissoras de metais no meio ambiente. Foi selecionada a espécie de siri *Callinectes danae* como biomonitor e o estuário de Santos como área de estudo. Numa primeira etapa e considerando que o siri é um organismo bentônico, foi realizada uma avaliação preliminar do teor de metais no sedimento do estuário. Em seguida, foi realizada uma avaliação preliminar do teor de metais nos diferentes tecidos de indivíduos coletados na região (brânquias, hepatopâncreas e músculos). Baseado nos experimentos anteriores, foi proposto um modelo de distribuição dos metais entre os tecidos e destes em relação aos sedimentos. A validação deste modelo de distribuição (assinatura química) foi realizada por meio de um conjunto de procedimentos que visaram testar: 1) a robustez em função do tempo; 2) a especificidade para a região de estudo; 3) a sensibilidade às alterações dos níveis de metais em cada tecido. A partir deste modelo, foram identificados indícios para atribuição de fontes emissoras de metais. Desta forma, concluiu-se que, para a região do estuário de Santos, o siri da espécie *C. danae* pode ser utilizado como um biomonitor. O modelo proposto foi eficaz, uma vez que foi capaz de responder de forma conclusiva-positiva a todos os testes realizados na sua validação, confirmando esta espécie como um biomonitor definitivo para região. A robustez do modelo irá aumentar com novas coletas e a realimentação do banco de dados.

Palavras-chave: Baixada Santista, estuário de Santos, metais, siri, *Callinectes danae*

ASSESSMENT OF CRABS *Callinectes danae* AS DEFINITIVE BIOMONITORS OF METAL EMISSIONS

Isabella Cristina da Costa Leal Bordon

ABSTRACT

This study aimed to develop a new methodology for the use of a biomonitor in the identification of metal discharges in environmental evaluations. Crabs of *Callinectes danae* species were used in an evaluation conducted in the Santos Estuarine System. In the first experiment and since *C. danae* is a benthic species, a preliminary assessment of the metal concentrations in sediment samples collected in the Santos Estuarine System was performed. Subsequently, a preliminary assessment of metal concentrations in the *C. danae* tissues was also performed. The last experiment aimed to identify a chemical fingerprint for the Santos Estuarine System. The development of validation procedures for this model (chemical fingerprint) was conducted and aimed to test: 1) the stability of this model through time; 2) its local specificity for the Santos Estuarine System; 3) the sensibility of this model due to modifications in the metal concentrations in each tissue (gills, hepatopancreas and muscles). By the use of this model, it was possible to identify the sources of metal emissions. According to the results, *C. danae* can be used as a biomonitor for the Santos Estuarine System. The established model was able to respond in a positive-conclusive way to all the tests performed in its validation, confirming this species as a definitive biomonitor for this area. Thus, the stability of this model will increase with new sampling campaigns and consequently introduction of new information in the database.

Keywords: Baixada Santista, Santos estuarine system, metals, swimming crab, *Callinectes danae*

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	27
2.HIPÓTESE.....	32
3.OBJETIVOS.....	33
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	34
4.1.Situação da ocupação na zona costeira brasileira: ênfase na Baixada Santista.....	34
4.2.Breve histórico do monitoramento ambiental no estuário de Santos - São Vicente.....	35
4.3. Caracterizando a contaminação: o sedimento.....	37
5. ETAPAS DE ESTUDO.....	40
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
6.1.Etapa 1: Avaliação preliminar do sedimento.....	42
6.2.Etapa 2: Análise preliminar do teor de metais em tecidos de <i>C. danae</i>	46
6.3.Etapa 3: Análise de assinaturas químicas: tecidos de siri <i>C. danae</i> e sedimento.....	51
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
7.1.Etapa 1.....	59
7.2.Etapa 2.....	68
7.3.Etapa 3.....	74
8. CONCLUSÕES.....	147
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
10.APÊNDICES.....	161
11.ANEXOS.....	170

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Áreas delimitadas para o estudo e seus respectivos pontos de coleta, com coordenadas geográficas.....	51
TABELA 2: Concentrações de metais obtidas nas análises do material de referência Buffalo River sediment, valores certificados, recuperação (em %), validação do método de digestão para Buffalo River sediment apresentada no método 3051A e recuperação (em %) segundo esta validação.....	59
TABELA 3: Concentrações dos metais, percentual de silte-argila e COT das amostras de sedimento do sistema estuarino de Santos (n=16). Valores acima de TEL estão em negrito e valores acima de PEL estão em negrito e sublinhado.....	60
TABELA 4:Correlação de Pearson para os metais, percentual de silte-argila e COT analisados em amostras de sedimento (n=16) do sistema estuarino de Santos.....	63
TABELA 5: Caracterização dos grupos definidos pela composição química.....	68
TABELA 6: Sexo, estágio de maturação (EM), peso total (PT), comprimento (CC) e largura (LC) da carapaça dos indivíduos analisados da espécie <i>C. danae</i> (n=10).....	69
TABELA 7: Concentrações de metais obtidas nas análises dos materiais de referência TORT-2 e Oyster tissue, valores certificados e recuperação (em %)...	70
TABELA 8: Limites de detecção (LD) para cada metal de interesse.....	70

TABELA 9: Concentração média, valores mínimos e máximos de metais nas brânquias, no hepatopâncreas e nos músculos (base úmida) dos indivíduos analisados de <i>C. danae</i> (n=10).....	71
TABELA 10: Dados biométricos por ponto de coleta e totais dos siris coletados em agosto/2011(n=82).....	74
TABELA 11: Dados biométricos por ponto de coleta e totais dos siris coletados em dezembro/2011(n=86).....	75
TABELA 12: Concentrações de metais obtidas nas análises dos materiais de referência TORT-2, Oyster tissue e Buffalo River sediment; valores certificados e recuperação (em %).....	76
TABELA 13: Limites de detecção (LD) para as amostras de siri (a) e de sedimento (b).....	77
TABELA 14: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de <i>C. danae</i> coletados em agosto/2011 (n=246). Valores com letras <u>iguais</u> (a,b,c...) numa mesma coluna (metal) indicam significância (Kruskal-Wallis: $p<0,05$).....	78
TABELA 15: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de <i>C. danae</i> coletados em dezembro/2011(n=258). Valores com letras <u>iguais</u> (a,b,c...) numa mesma coluna (metal) indicam significância (Kruskal-Wallis: $p<0,05$).....	79
TABELA 16: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nas amostras de sedimento coletadas em agosto/2011 (n=27) e dezembro/2011 (n=27) e valores TEL e PEL segundo à Legislação Canadense (CCME, 2001).....	81

TABELA 17: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris coletadas em agosto/2011 (n=246).....	84
TABELA 18: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris coletadas em dezembro/2011(n=258).....	86
TABELA 19: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris (n=246) e de sedimento (n=54) coletadas em agosto/2011.....	90
TABELA 20: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris (n=258) e de sedimento (n=54) coletadas em dezembro/2011.....	92
TABELA 21: Sexo, estágio de maturação (EM), peso total (PT), comprimento (CC) e largura (LC) da carapaça dos indivíduos analisados da espécie <i>C. danae</i> coletados no estuário de Santos (n= 9) e em Ilha Grande (n=7) no período de março/2013.....	97
TABELA 22: Concentrações de metais obtidas nas amostras do material de referência DORM-3, valores certificados e recuperação (em %).....	97
TABELA 23: Limites de detecção (LD) para as amostras de siri coletadas em março/2013 (ICPMS).....	98
TABELA 24: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de <i>C. danae</i> coletados no estuário de Santos em março/2013 (n=27).....	98
TABELA 25: Parâmetros da análise discriminante realizada com os dados das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto e dezembro/2011, com	

adição dos dados de concentração de metais das amostras de tecidos de siris (n=27) coletados no estuário de Santos em março/2013.....101

TABELA 26: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de *C. danae* coletados em Ilha Grande em março/2013 (n=18).....102

TABELA 27: Parâmetros da análise discriminante realizada com os dados das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados de concentração de metais das amostras de tecidos de siris (n=18) coletados em Ilha Grande em março/2013.....105

TABELA 28: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais nas brânquias, hepatopâncreas, músculos (base úmida; n= 246) e sedimento (n=54) nas áreas 1 (canal de São Vicente- a), 2 (região próxima ao polo de Cubatão- b) e 3 (canal de Santos- c) no período de agosto/2011.....131

TABELA 29: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais nas brânquias, hepatopâncreas, músculos (base úmida; n=258) e sedimento (n=54) nas áreas 1 (canal de São Vicente- a), 2 (região próxima ao polo de Cubatão- b) e 3 (canal de Santos- c) no período de dezembro/2011.....132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Vistas dorsal (a) e frontal (b) de <i>C. danae</i>	30
FIGURA 2: Fluxograma de trabalho.....	40
FIGURA 3: Malha amostral utilizada na coleta preliminar de sedimentos do estuário de Santos, baseada em Hortellani et al. (2008).....	42
FIGURA 4: Estuário de Santos. O ponto em amarelo indica o local de coleta com rede de arrasto, a qual também contemplou indivíduos da espécie <i>C. danae</i> (Fonte: Google Earth).....	46
FIGURA 5: <i>C. danae</i> , com indicações de largura sem espinhos (LC) e comprimento (CC) da carapaça (a); sexo e estágio de maturação conforme forma e aderência do abdome (b=macho, com abdome em T; c= fêmea imatura, com abdome triangular; d=fêmea madura, com abdome oval).....	47
FIGURA 6: Dissecção de <i>C. danae</i> e separação dos tecidos.....	48
FIGURA 7: Estuário de Santos. Os pontos em amarelo indicam os locais de coleta de indivíduos da espécie <i>C. danae</i> e de sedimento (Fonte: Google Earth).....	52
FIGURA 8: Localização do estuário de Santos, SP (amarelo) e de Ilha Grande, RJ (vermelho) (Fonte: Google Earth).....	55
FIGURA 9: Gráficos com as amostras de sedimentos dos 16 pontos de coleta em função das coordenadas dos 3 componentes principais mais significativos (a =CP1xCP2, b= CP1xCP3 com os 16 pontos, c= CP1xCP2 com os metais mensurados). Legenda: Mud = silte-argila; TOC = Carbono Orgânico Total - COT).....	65

FIGURA 10: Dendograma referente à análise de cluster para concentração de metais em sedimentos de superfície coletados em pontos distribuídos ao longo do estuário de Santos.....67

FIGURA 11: Gráficos com as amostras de músculos, brânquias e hepatopâncreas de siris em função das coordenadas das duas componentes principais mais significativas (a = PC1xPC2 com os dados de siri, b= PC1xPC2 com os metais mensurados).....73

FIGURA 12: Função discriminante I *versus* função discriminante II dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) coletadas em agosto/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....84

FIGURA 13: Função discriminante I *versus* função discriminante II dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) coletadas em dezembro/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....86

FIGURA 14: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....89

FIGURA 15: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em dezembro/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....91

FIGURA 16: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias). As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%.....100

FIGURA 17: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas em Ilha Grande em março/2013 (M_RJ= músculo; H_RJ= hepatopâncreas; B_RJ= brânquias). As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%.....104

FIGURA 18: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 0,5. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....106

FIGURA 19: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 2. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....107

FIGURA 20: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 5. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....107

FIGURA 21: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 10. As elipses são referentes à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....108

FIGURA 22: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....108

FIGURA 23: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 40. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....109

FIGURA 24: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 100. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....109

FIGURA 25 Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....111

FIGURA 26: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....112

FIGURA 27: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....112

FIGURA 28: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....113

FIGURA 29: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....113

FIGURA 30: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....115

FIGURA 31: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....116

FIGURA 32: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....116

FIGURA 33: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....117

FIGURA 34: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....117

FIGURA 35: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 40. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....118

FIGURA 36: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 100. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....118

FIGURA 37: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....120

FIGURA 38: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....121

FIGURA 39: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....121

FIGURA 40: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....122

FIGURA 41: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....123

FIGURA 42: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....124

FIGURA 43: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....124

FIGURA 44: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....126

FIGURA 45: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....127

FIGURA 46: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....127

FIGURA 47: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013 (M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 10. As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%.....128

FIGURA 48: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....128

FIGURA 49: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 1 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....135

FIGURA 50: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 2 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....137

FIGURA 51: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 3 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....139

FIGURA 52: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 1- Canal de São Vicente. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....141

FIGURA 53: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 2- Próximo ao Pólo de Cubatão. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....142

FIGURA 54: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 3- Canal de Santos As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....142

FIGURA 55: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 1 (Canal de São Vicente), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....143

FIGURA 56: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 2 (Próximo ao Pólo de Cubatão), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....144

FIGURA 57: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 3 (Canal de Santos), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.....144

FIGURA 58: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 2 (Próximo ao Pólo de Cubatão), considerando os dados de março/2013 como parte integrante desta base. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.....145

1. INTRODUÇÃO

A destinação incorreta dada à grande parte dos poluentes produzidos pela sociedade moderna tem gerado cada vez mais problemas ambientais em nível global. Principalmente a partir do século passado, a maior parte do impacto causado pelo homem teve como consequência a alteração nas concentrações de diversos elementos químicos nos compartimentos ambientais. Além disso, houve a criação e introdução de novas substâncias químicas no ambiente, cujos efeitos potencialmente tóxicos ainda são desconhecidos. A maioria desses poluentes é exógena ao metabolismo normal dos organismos, sendo denominados como xenobióticos (Hodgson e Levi,1994; Van Leeuwen e Hermens,1995; Walker et al.,1996). Os xenobióticos podem ser divididos em duas grandes classes:

- inorgânicos: são em sua grande maioria metais ou ânions. Dentre os ânions, podem ser citados os nitratos e os fosfatos, que não são considerados particularmente tóxicos, mas que podem causar problemas ambientais (eutrofização) se presentes em grande quantidade em função do uso de fertilizantes ou quando liberados através dos esgotos não-tratados.

Dentre os metais (tanto em sua forma iônica quanto associados a radicais orgânicos e inorgânicos), o cádmio (Cd), o chumbo (Pb), o cobalto (Co), o cromo (Cr) e o mercúrio (Hg) ocupam um local de destaque, em função da sua conhecida toxicidade para os sistemas biológicos.

- orgânicos: são os compostos formados por cadeias de carbono. Dentre eles, estão os hidrocarbonetos (alifáticos, ramificados, cíclicos e aromáticos), as bifenilas policloradas (PCB), os dibenzofuranos policlorados (PCDF) e as dibenzodioxinas policloradas (PCDD), os organoclorados (inseticidas de primeira geração, DDT e compostos relacionados), os organofosforados e carbamatos (inseticidas de segunda geração), os piretróides (inseticidas de terceira geração), clorofenóis e outras classes de compostos utilizados como herbicidas, detergentes e rodenticidas.

Por longo período, os ambientes aquáticos foram considerados um destino apropriado para os resíduos produzidos pela sociedade. Um dos conceitos equivocados nos quais esta conduta esteve baseada até então refere-

se à uma suposta capacidade infinita dos oceanos em absorver resíduos, pela diluição de substâncias potencialmente tóxicas uma solução para o problema (Jobling, 1995). Como consequência deste pensamento, observou-se mudanças significativas na qualidade dos habitats marinhos e estuarinos, principalmente pela liberação de resíduos e substâncias químicas diretamente nos corpos d'água.

A introdução de contaminantes em ambientes costeiros, em geral, ocorre por esgotos domésticos e industriais (Abessa et al., 2005), atividades de mineração, lixiviação e percolação a partir de aterros, liberação a partir de embarcações, transporte por rios, deposição atmosférica, agricultura e atividades de aquicultura intensivas (Kennish, 1991; Goldberg et al. 2001), atividades portuárias ou marinas, extração de petróleo e derramamentos acidentais de vários produtos químicos (Prósperi e Nascimento, 2006), entre outros.

Os estuários, em particular, representam regiões sensíveis à poluição, pois além de receberem diretamente grande aporte de contaminantes, também apresentam condições que propiciam seu acúmulo desses, o que acaba contaminando e/ou intoxicando a vida aquática local. De acordo com Forstner e Wittmann (1983), os processos naturais como intemperismo, erosão e transporte nos continentes, bem como padrões ambientais que controlam o ciclo biogeoquímico dos elementos, têm sido quantitativamente alterados pelas atividades antrópicas em geral. À medida que esses elementos são transportados e depositados nos ecossistemas, eles tendem a se deslocar para os sistemas adjacentes e, posteriormente, incorporam-se aos vários compartimentos ambientais existentes no meio circundante, modificando a composição química dos sítios abióticos e bióticos.

Episódios de contaminação em diversas regiões costeiras do mundo levaram muitos países a estabelecer extensos programas de monitoramento. (Semmler, 2007). Pode-se verificar, mundialmente, que o aumento nos níveis de contaminantes tem levado à formulação de estratégias para diminuir o impacto causado nos ecossistemas estuarinos e costeiros (Maia et al., 2006). Dentre estas estratégias, está o uso de organismos cosmopolitas para acesso à poluição (conhecida como biomonitoramento) (Conti, 2008).

O biomonitoramento ambiental tem sido desenvolvido consideravelmente nas últimas décadas. Os organismos utilizados para este fim absorvem os contaminantes ambientais e assim podem servir como indicadores da presença destes contaminantes ao longo do tempo, permitindo, em certos casos, a comparação entre níveis de contaminação em áreas geograficamente diferentes (Conti, 2008).

Entre os organismos utilizados mundialmente, os bivalves tem se destacado em diversos estudos (Boening, 1999; Ostapczuk et al., 1997; Bechmann et al., 2001; Chafik et al., 2001; Yusof et al., 2004; Bodin et al., 2013). Entretanto, vários estudos incluem outros organismos como biomonitores do ambiente marinho, como algas (Villares et al., 2001; Conti e Cecchetti, 2003; Gosavi et al., 2004; Zbikowski et al., 2007), poliquetas (Ruelas-Inzunza et al., 2002; Casado-Martinez et al., 2008), crustáceos (Paéz-Osuna e Ruiz-Fernández, 1995; Paéz-Osuna e Tron-Mayen, 1996; Chou et al., 2002; Virga et al., 2007; Virga e Geraldo, 2008) e mamíferos (Ruelas-Inzunza e Páez-Osuna, 2002).

No Brasil, estudos têm sido realizados visando o uso de organismos marinhos como biomonitores, principalmente bivalves. O mexilhão da espécie *Perna perna*, presente ao longo de uma grande extensão da costa brasileira, é frequentemente utilizado em estudos de biomonitoramento costeiro (Pfeiffer et al., 1985; Costa et al., 2000; Kehrig et al., 2001; Curtius et al., 2003). Entretanto, em regiões estuarinas, outros biomonitores devem ser utilizados, já que *Perna perna* não ocorre nessas áreas. No caso específico do estuário de Santos, o biomonitoramento pode ser dificultado, uma vez que nele ocorrem atividades portuárias e industriais, além da questão hidrodinâmica e alterações físico-químicas complexas, causando variações bruscas nos níveis dos contaminantes. Dessa forma, faz-se necessário a identificação de biomonitores representativos, assim como um modelo de biomonitoramento que garanta a robustez dos resultados face a essas condições, evitando com isso falsos positivos e/ou falsos negativos.

Dentre os organismos que poderiam ser avaliados para este fim estão os siris da espécie *Callinectes danae* (Smith, 1869) (FIG. 1). Distribui-se no Atlântico Ocidental, em Bermudas, Flórida, Golfo do México, Antilhas, Colômbia,

Venezuela, Brasil (Paraíba ao Rio Grande do Sul) e Argentina (Costa e Negreiros-Fransozo, 1998). Apresenta grande tolerância à salinidade, podendo ocupar áreas estuarinas, particularmente aquelas com sedimento lodoso, até regiões costeiras e de mar aberto, da região do entre-marés até 75m de profundidade (Melo, 1996). As fêmeas atingem tamanho de primeira maturação, em média, com 8,4 cm de largura da carapaça e com um ano e meio de idade (Branco e Avilar, 1992). No que diz respeito a sua presença no estuário de Santos, *C. danae* possui importância ecológica e também social, visto que é um recurso intensamente explorado por pescadores, principalmente das comunidades locais (Severino - Rodrigues et al., 2001).

FIGURA 1: Vistas dorsal (a) e frontal (b) de *C. danae*.

A maioria das fêmeas ovígeras de *C. danae* migram para o mar aberto, ficando longe dos machos nesse período. A predominância dos machos ocorre apenas na época de acasalamento. Essa migração para desova e eclosão das larvas tem sido associada com a necessidade de águas mais salinas para o desenvolvimento embrionário (Barreto et al., 2006).

São organismos predadores, alimentando-se de pequenos crustáceos, peixes, camarões, anfípodos, bivalves e poliquetos (Sastre et al., 1999). São também organismos que promovem a reciclagem dos nutrientes dentro do manguezal (detritívoros), colocando-os a disponibilidade de outros organismos.

Os siris da família Portunidae, que inclui as espécies do gênero *Callinectes*, caracterizam-se por possuírem carapaça ovalada achatada dorso -

ventralmente, provida por espinhos, quatro pares de patas ambulatórias (pereiópodos), sendo o último par adaptado à natação (Hickman et al., 2004). Como anatomia característica, *C. danae* apresenta cefalotórax com quatro dentes frontais, com par mediano possuindo não mais do que a metade do comprimento do par lateral; os gonópodos dos machos alcançando além do ponto mediano do esternito VI, se cruzando entre si, perto da base (Furia et al., 2008).

Em geral, há poucos registros sobre a avaliação da presença de metais em *C. danae*. No estuário de Santos, Harris e Santos (2000) discorreram sobre as concentrações de cobre (Cu), cádmio (Cd), zinco (Zn) e ferro (Fe) em tecidos de *C. danae* coletados no Rio Casqueiro e sua correlação com alterações fisiológicas. Virga et al. (2007) e Virga e Geraldo (2008) já haviam investigado as concentrações de chumbo (Pb), cádmio (Cd), cromo (Cr), zinco (Zn) e cobre (Cu) em indivíduos do gênero *Callinectes* (incluindo *C. danae*) coletados apenas no Rio Cubatão. Concentrações de metais como Alumínio (Al), cobalto (Co), mercúrio (Hg) e níquel (Ni) ainda não tinham sido avaliadas para esta espécie até recentemente.

No que se refere à outras espécies do gênero *Callinectes*, se observa uma sensibilidade quanto às alterações locais nas concentrações de metais. Em músculos de *Callinectes ornatus* coletados na Lagoa de Iquiparí (RJ), Andrade et al. (2011) encontraram concentrações de Cr, Ni, Pb e Cd abaixo do limite de detecção, embora as concentrações de Zn tenham alcançado $21,1 \mu\text{g g}^{-1}$ no período chuvoso e $27,5 \mu\text{g g}^{-1}$, no período seco. Rossi (2009), avaliando metais em tecidos de *Callinectes bocourti* provenientes da lagoa de Mundaú (AL), encontrou valores médios de Cu e Zn nos músculos de $5,1 \pm 1,4$ e $28,3 \pm 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Reichmuth et al. (2010) encontraram maior concentração de Hg e Zn, respectivamente, nos músculos e no hepatopâncreas de *Callinectes sapidus* coletados em estuários dos E.U.A. Entretanto, Jop et al. (1997) não encontraram este padrão ao avaliar metais em tecidos de *Callinectes sapidus* também coletados naquele país. De acordo com Sastre et al. (1999), a bioacumulação de metais em siris do gênero *Callinectes* é bastante variável com o sexo, o tipo de tecido, o local de estudo e a espécie.

2. HIPÓTESE

A tolerância à salinidade de *C. danae* viabiliza deslocamentos tróficos e reprodutivos, aumentando a capacidade de aproveitamento do ambiente disponível para abrigar os contingentes dos diferentes estratos populacionais. E devido à sua abrangência espacial na região estuarina de Santos, justifica-se sua possível utilização como biomonitores, uma vez que podem ser encontrados ao longo de todo estuário. Isso possibilita uma avaliação de padrões de acumulação de elementos metálicos em seus tecidos, diretamente ligados à região de estudo e às atividades antrópicas nela realizadas.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma nova proposta de uso de um biomonitor na identificação de fontes emissoras de metais. Foi selecionada a espécie de siri *C. danae* como biomonitor e o estuário de Santos como área de coleta.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar as concentrações de metais (Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn) no sedimento local (visto que o siri-azul é um organismo bentônico);

- Avaliar as concentrações desses metais nas brânquias, hepatopâncreas e músculos dos siris e como esses dados permitiram a identificação de cada tipo de tecido;

- Sendo historicamente utilizada a concentração de metais no sedimento para fins de monitoramento ambiental, identificar possíveis relações entre as concentrações obtidas neste compartimento e as obtidas nos tecidos;

- Identificar uma assinatura química para o estuário de Santos, refletida nos tecidos dos siris coletados e relacionada ao sedimento local (critério aqui denominado como o caráter definitivo do biomonitor);

- Verificar a possibilidade de atribuição das fontes de emissão mais representativas do estuário de Santos a partir de alterações neste modelo (assinatura química);

- Validar temporal e espacialmente este modelo estabelecido para o estuário e, através de amostras-teste e simulações, identificar possíveis fatores que pudessem alterar a conformação da assinatura química.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Situação da ocupação na zona costeira brasileira: ênfase na Baixada Santista

Com cerca de 8,5 mil quilômetros de extensão, a zona costeira brasileira concentra cerca de 25% da população do país (o que representa 42 milhões de pessoas), abrigadas em aproximadamente 400 municípios. A densidade demográfica média é de 90 hab/km², o que equivale a cinco vezes a média nacional (19 hab/km²). Aproximadamente 36 milhões de pessoas (89% do total) habitam áreas urbanas, sendo que 13 das 17 capitais dos estados litorâneos situam-se à beira mar. As atividades econômicas na zona costeira são responsáveis por cerca de 73% do PIB nacional (Serafim e Hazin, 2006). Como consequência desta expansão urbana sem planejamento, os problemas da poluição marinha ao longo da costa brasileira têm se agravado.

Apenas 20% da população costeira dispõem de sistemas de coleta e tratamento de esgoto, sendo 90% do lixo coletado encaminhado para aterros sanitários a céu aberto. Pelo menos metade destes aterros estão localizados próximos ao mar, rios, lagoas ou áreas de preservação ambiental. Os problemas ambientais causados pelo setor industrial são considerados ainda mais graves, pois algumas indústrias liberam no ambiente uma vasta gama de substâncias potencialmente e reconhecidas como tóxicas, principalmente através da descarga direta dos efluentes não-tratados e das emissões atmosféricas (CNIO, 1998).

A Baixada Santista, região central do litoral paulista, abrange a área entre os municípios de Bertioga e Peruíbe, estendendo-se até a escarpa da serra do Mar, para o interior. Essa região ocupa uma área de 51.500 ha, onde 5.000 ha correspondem às águas (rio e braços de mar), 6.700 ha às montanhas (morros isolados), 10.800 ha de mangue e 29.000 ha de áreas remanescentes, inclusive de áreas urbanizadas (Boldrini, 1990). O estuário de Santos, onde está localizada a região metropolitana da Baixada Santista, é formado pela baía de Santos e um complexo de rios (Piaçabuçu, Paranhos, Cubatão, Morrão, Perequê, Mogi da Onça, Quilombo, Jurubatuba, Diana, Santo Amaro, Bertioga, Casqueiro, Santa,

entre outros), além de vários canais como os de Bertioga, Barreiros, Piaçaguera, Mar Pequeno, e, ainda, os lagos de Pompeba, Candinho, São Vicente e o de Santa Rita (Siqueira et al., 2004a). Encontram-se, ainda, nessa região, cidades densamente povoadas, tais como Praia Grande, São Vicente, Cubatão, Santos e Guarujá (Braga et al., 2000; Siqueira, 2003). O município de Cubatão assume um posto estratégico nessa região, pois abriga um dos mais importantes polos industriais do país, contendo mais de uma centena de fábricas, incluindo indústrias químicas, petroquímicas e de fertilizantes, além de uma grande siderúrgica, as quais, segundo CETESB (Lamparelli et al., 2001) são as principais fontes de contaminação do sistema local.

Muitos estudos vêm permitindo o refinamento do conhecimento sobre os principais resíduos que contribuem para a alteração do meio ambiente dessa região e a grande maioria preocupa-se com a qualidade do sedimento local (Abessa et al., 2005; Hortellani et al., 2008; Luiz-Silva et al., 2008, Bordon et al., 2011). Comum à maioria desses estudos é a preocupação em identificar os níveis de contaminantes, sem fazer uma avaliação que permita uma atribuição quanto a sua procedência.

4.2. Breve histórico do monitoramento ambiental no estuário de Santos - São Vicente

A necessidade de monitoramento ambiental na região do estuário de Santos e São Vicente remonta a década de 1970, quando foram iniciados estudos pioneiros sobre as condições do meio ambiente em função da expansão urbana e industrial. Importante registrar que deste período até meados da década de 90, a maior parte da literatura sobre a região ficou restrita a apresentação de relatórios de órgãos fiscalizadores, dissertações e teses acadêmicas e apresentações em congressos da área ambiental.

Tommasi (1979) e CETESB (1979, 1981) mostraram o comprometimento do ambiente aquático da região através da avaliação de águas, sedimentos e estimativa dos bentos do estuário e da baía de Santos. A poluição de origem doméstica e industrial foi apontada como responsável pelas degradações química e microbiológica desses sistemas. Também foram

registradas alterações físicas dos habitats em função dos processos de erosão, assoreamento, aterros de canais e manguezais e intervenções no sistema de drenagem (Lamparelli et al., 2001).

Entre 1982 e 1984, levantamentos mostraram que os manguezais da região também estavam sendo alterados, sendo identificados locais com elevada contaminação por metais.

Em 1984, foi efetivado pela CETESB o "Programa de Recuperação da Qualidade Ambiental de Cubatão", que implantou um sistema de tratamento de efluentes industriais em todas as fábricas da região, resultando na redução da carga de poluentes para o sistema hídrico. A partir disso, observou-se gradual recuperação dos ecossistemas aquáticos e estuarinos, com o aumento da diversidade de aves e organismos aquáticos e a intensificação da pesca.

Apesar destes esforços, Pfeiffer et al. (1988) encontraram altas concentrações de elementos metálicos na Baía de Santos e destacaram que os elementos Pb, Cd, Zn, Cu, Cr e Hg encontrados na região eram provenientes do Complexo Industrial de Cubatão e da ocupação urbana desta região.

Logo, na década de 1990, o principal objetivo para melhorar o que começava a ganhar contornos de monitoramento ambiental foi o aperfeiçoamento dos sistemas de controle de poluição das águas e do solo na região. As indústrias iniciaram a implantação de novos sistemas de recirculação de efluentes e de reutilização de águas. Como consequência dessas ações de controle da poluição, esperava-se uma redução na exposição da fauna e consequentemente, da população local aos contaminantes. Contudo, levantamentos realizados por Prósperi et al.(1998) e Abessa (2002) apontaram a persistência de poluentes potencialmente disponíveis à biota aquática nos sedimentos dragados dos canais portuários, colocando em risco a saúde pública e o equilíbrio ecológico dos ecossistemas costeiros da região.

Em 2001, Lamparelli e outros autores elaboraram, junto a CETESB, o que se considera até hoje como o último relatório sistemático sobre a condição ambiental do estuário de Santos e São Vicente. Os autores ressaltaram novamente a persistência de metais e compostos orgânicos nos sedimentos, na

água e nos organismos e discutiram sobre a necessidade de controle mais efetivo dos efluentes industriais.

Diversos pesquisadores de diferentes áreas continuaram trabalhando neste contexto, compartilhando informações valiosas sobre a condição ambiental do estuário de Santos e São Vicente. Abessa et al. (2005) avaliaram a influência do emissário submarino de Santos na toxicidade dos sedimentos, fornecendo evidências de que os lançamentos provenientes do emissário alteram a qualidade da baía de Santos. Cesar et al.(2007), além de mensurar dados de toxicidade do sedimento e integrá-los com dados físico-químicos do estuário, compararam a qualidade deste sedimento com aquele encontrado no Golfo de Cádiz, na Espanha. Hortellani et al.(2008) avaliaram a contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos –São Vicente e observaram que o aumento nas concentrações de certos elementos estava relacionado à atividades humanas e a processos naturais de intemperismo. Luiz-Silva et al. (2008) em estudo sobre o histórico da contaminação e as fontes de contaminantes em sedimentos do rio Morrão, observou que certos elementos como Cr, Mn, Ni, Zn, Ga, Ag, Cd, Sn, Sb, Pb e Bi estavam associados ao Fe, derivados de atividades siderúrgicas, enquanto Be, Ca, Sc, Co, Cu, Sr, Y, Zr, Nb, Hf, Ta, Th e U estiveram associados ao P, relacionados ao processo produtivo de fertilizantes.

4.3. Caracterizando a contaminação: o sedimento

Como visto, a literatura que contempla o estuário de Santos e São Vicente é vasta, principalmente no que diz respeito ao monitoramento de metais no sedimento. Luiz-Silva et al.(2006) observaram que há maior concentração para a maioria dos elementos analisados no verão e/ou na primavera e do Mn no outono e inverno no rio Morrão. Além disso, através de testemunho colhido no rio Casqueiro, os mesmos autores observaram que nos sedimentos referentes aos períodos anteriores ao processo industrial na região, as concentrações dos metais foram mais homogêneas e contrastantes com as altas concentrações encontradas nos sedimento do topo (mais recentes). Fukumoto (2007) também estudou o histórico da contaminação da área por metais através de testemunhos coletados próximos a fontes de poluição, porém observou que as concentrações de Pb, Cu,

Cr e Zn não tiveram seus maiores teores registrados na superfície e sim a alguns centímetros de profundidade (embora tenham apresentado uma tendência de aumento em direção ao topo).

No estuário, as fontes de contaminação por metais são diversas, incluindo deposição atmosférica e descarga de águas residuais. Na zona de mistura de águas estuarinas e marinha, ocorrem modificações físico-químicas que, associada a processos hidrodinâmicos particulares, influenciam na distribuição dos metais no material particulado em suspensão e também na composição do sedimento depositado. A diminuição da salinidade aumenta a disponibilidade de metais nesta zona. O material coloidal é desestabilizado por ação do gradiente de íons, floclula e acaba precipitando. Por ação das marés e da vazão do rio, este material particulado é ressuspenso num processo cíclico, e a alteração dos fatores físico-químicos pode liberar ou não esses metais novamente.

Nos últimos 10 anos, não se tem conhecimento de nenhuma nova atividade industrial dentro do complexo industrial de Cubatão e nos arredores do estuário, exceto construções novas referentes às indústrias já estabelecidas, como a ampliação da aciaria, a instalação do lingotamento contínuo e da unidade de laminação a quente da Companhia Siderúrgica Paulista, atual USIMINAS (COSIPA, 2008). O fluxo de embarcações no Porto de Santos vem crescendo consideravelmente. A movimentação acumulada de 2010 foi recorde para o período, somando 96.025.258 t, 15,4% superior ao verificado em 2009 (83.194.129 t). As exportações totalizaram 64.166.555 t, acréscimo de 4.831.976 t em relação a 2009 (8,1%), enquanto as importações atingiram 31.858.703 t, 7.999.153 t mais que o volume de 2009 (33,5%). No total, 5.748 navios atracaram no porto santista em 2010 (CODESP, 2010). Como consequências, periodicamente, procedimentos de dragagem de manutenção e de aprofundamento do canal do Porto são realizados pela Companhia de Docas do Estado de São Paulo (CODESP), sendo o sedimento resultante descartado próximo da Ilha da Moela. A expansão urbana é refletida no aumento na taxa de produção de resíduos domésticos. A carência dos serviços de coleta e tratamento destes resíduos nos municípios da Baixada Santista (CETESB, 2013), os quais

não atendem toda a população fixa e são pouco eficientes em períodos de aumento de fluxo de turistas, provoca o aumento do descarte de resíduos domésticos no estuário. Segundo CETESB (2011), das 105 emergências químicas atendidas pela agência de janeiro a março de 2011, 15% ocorreram no litoral paulista.

Ainda que as emissões de resíduos tenham sofrido alterações em seus volumes e composição por diversos motivos, os empreendimentos industriais e portuários permaneceram exercendo as mesmas atividades. Assim sendo, desconsiderando as localidades em que os procedimentos de dragagem sejam mais intensos, como nas proximidades do Porto de Santos, se as fontes de emissões permanecem iguais, as proporções dos contaminantes presentes nos descartes, e conseqüentemente no sedimento, também devem permanecer os mesmos.

5. ETAPAS DE ESTUDO

Para facilitar a compreensão, o presente trabalho foi dividido em etapas (FIG.2). Cada uma foi descrita separadamente em subitens, com as metodologias utilizadas, seus respectivos resultados e discussões.

FIGURA 2: Fluxograma de trabalho

Visto que o siri é um organismo bentônico, a etapa 1 teve como principal objetivo verificar como os metais estavam distribuídos no sedimento ao longo do estuário de Santos.

Na etapa 2, foi avaliada preliminarmente a acumulação de metais nos tecidos dos organismos da espécie *C. danae*.

Na FIG. 2, são indicados os artigos publicados referentes aos experimentos realizados nas etapas 1 e 2.

Já na etapa 3, o objetivo principal foi avaliar o caráter definitivo dos siris como biomonitores pela verificação de um padrão de distribuição dos metais nos

tecidos dos siris (identificação de uma assinatura química característica do estuário de Santos e diretamente relacionada ao sedimento). Foi também verificada a possibilidade de atribuição de fontes de emissão de metais por meio da modificação nesta distribuição de dados. No final deste documento, encontra-se a conclusão, que resume as considerações finais desse conjunto de etapas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Etapa 1: Avaliação preliminar do sedimento

Durante o inverno de 2010, amostras de sedimento superficial (até 2 cm) foram coletadas em pontos ao longo do estuário de Santos utilizando uma draga de tipo Ekman, descontando-se a parte que estava em contato com as paredes da draga. A malha amostral abordada (FIG. 3) foi baseada naquela utilizada por Hortellani et al. (2008).

FIGURA 3: Malha amostral utilizada na coleta preliminar de sedimentos do estuário de Santos, baseada em Hortellani et al. (2008).

Após coleta, as amostras foram levadas imediatamente ao laboratório e congeladas a -20°C . Frações do sedimento foram sub-amostradas para as análises químicas e granulométricas, separadamente.

Trinta gramas de sedimento de cada ponto foram secos em temperatura ambiente por 72h. Então, as amostras foram peneiradas por 15 minutos em agitador RO-TAP, por meio de peneiras em escala WENT-WORTH (Wentworth, 1922). Para este estudo preliminar, silte-argila ($< 63\mu\text{m}$) foi a única categoria contemplada na discussão já que esta é responsável pela maior parte da adsorção de metais no sedimento (Hortellani et al., 2005).

Para a análise química, as amostras secas (em temperatura ambiente) de sedimento foram analisadas na sua fração total (< 2mm). A digestão das amostras foi realizada em sistema de microondas (CEM Corporation, modelo MARS 5). A solução de extração consistiu de uma mistura ácida de 9 mL de HNO₃ e 3 mL de HCl (3:1), de acordo com as recomendações do método 3051A (U.S.EPA, 2007). Essa mistura foi adicionada a 0,5g de sedimento ou material de referência certificado em frascos de Teflon HP-500, os quais foram adequadamente selados e colocados em microondas. A digestão ocorreu nas seguintes condições: estágio-1, potência: 600 W, tempo de rampa: 9 minutos, temperatura: 175°C, *hold time*: 4,5 minutos. Após resfriamento, os extratos foram transferidos para frascos tipo Falcon de 50 mL e o volume foi completado com 40 g de água tipo Milli-Q, a 18 MΩ.cm em 25 °C. A análise da concentração de metais foi feita após decantação ou centrifugação dos resíduos dos extratos.

Os seguintes metais foram analisados: Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn. O elemento Cd foi mensurado por meio de um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado (HR-ICPMS) marca Thermo Finnigan, modelo Element 1. Os elementos Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram analisados através de um espectrômetro de absorção atômica de chama “fast sequential” (AAS) marca Varian, modelo Spectr-AAS-220-FS. Para medir as concentrações de Al e Fe, os extratos das amostras de sedimento foram diluídos em 100 vezes antes da determinação. O elemento Hg foi analisado utilizando-se CV AAS, acoplado a um sistema de injeção em fluxo com geração de vapor frio (FIA). Através de válvula de injeção manual, foram injetados 500 µL da amostra digerida, em fluxo de 10 mL min⁻¹ de água Milli-Q. O Hg²⁺ é reduzido por SnCl₂ 25% (m/v) em HCl 25% (v/v) num fluxo de 1 mL min⁻¹. Argônio foi usado como gás carreador num fluxo constante de 200 mL min⁻¹.

A validação deste método foi feita analisando-se material de referência certificado (Buffalo River sediment- NIST SRM 2704).

O carbono orgânico total (COT) foi mensurado utilizando-se da técnica de infravermelho utilizando o equipamento LECO CS-400. A amostra é submetida à combustão total e um sensor infravermelho detecta o dióxido de carbono (CO₂)

gerado na combustão, imediatamente comparando este conteúdo com o carbono elementar na amostra.

Os resultados das análise química de metais foram comparados aos dois valores limítrofes considerados pela Legislação Canadense (CCME, 2001) e adotados por Lamparelli et al. (2001). *Threshold Effect Level* (TEL) é o limite abaixo do qual nenhum efeito adverso à comunidade biológica é observado e *Probable Effect Level* (PEL) é o nível onde prováveis efeitos adversos ocorrem na comunidade biológica. O percentual de silte-argila e o COT foram analisados e utilizados para comparação com os dados de concentração de metais por se tratarem de parâmetros importantes para entendimento da adsorção e liberação desses metais.

A interpretação dos dados foi realizada por meio de uma sequência de métodos estatísticos, a saber:

- A análise de correlação foi realizada através do coeficiente de Pearson, de acordo com Zar (1999). Este teste é amplamente empregado para observar relações diretas entre duas variáveis mensuradas a nível intervalar ou de razões. O coeficiente de Pearson (r) pode variar de -1 a $+1$, e quanto mais próximos desses valores, mais forte a associação das variáveis. O valor zero desse coeficiente indica ausência de correlação. Assim sendo, uma matriz de correlação foi elaborada, utilizando os parâmetros químicos, o percentual de silte-argila e o COT, em nível de significância $\alpha=0,05$. Desta forma, objetivou-se identificar possíveis relações entre as variáveis e processos relacionados com a deposição de metais em sedimentos.
- A análise de componentes principais (ACP) consiste em um teste interpretativo, o qual examina um grupo de k variáveis correlacionadas, transformando-as em outro conjunto de variáveis não correlacionadas e independentes, dispostas em um número menor de fatores- os componentes principais. No geral, deve-se dar maior ênfase àqueles que, juntos, descrevem cerca de 80% ou mais da variação, os quais, em alguns casos, estão representados pelo primeiro e segundo componentes (Ayres et al., 2007). Cada componente contém

informações para representar as amostras ou ainda auto vetores contendo informações sobre como cada variável se relaciona com as demais variáveis. Logo, a natureza multivariada dos dados pode ser representada em poucas dimensões (Hortellani et al., 2008). Assim sendo, esta análise foi utilizada para detectar correlações entre os pontos de coleta e os parâmetros químicos. Anteriormente à análise, os dados de concentrações de metais foram padronizados segundo:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{S_j}$$

onde $j=1, 2, \dots, p$ atributos e $i=1, 2, \dots, n$ objetos, Z_{ij} o valor padronizado de X_{ij} e $\bar{X}_j$ e S_j a média e o desvio padrão da coluna j . As variáveis assim padronizadas têm média nula e variância unitária. Segundo recomendação do manual do software utilizado para esta análise (STATISTICA 12, Statsoft), há duas razões para a padronização de dados. Primeiro, as unidades associadas aos atributos podem arbitrariamente afetar no grau de similaridade entre os objetos. Com a padronização o efeito dessa arbitrariedade é eliminado. Segundo, a padronização faz com que os atributos contribuam com o mesmo peso no cálculo do coeficiente de similaridade entre objetos. Se uma variável possui um intervalo de valores superior a um outro de uma outra variável, certamente a primeira variável contará com um peso maior na determinação do grau de similaridade entre objetos. Este efeito pode ser compensado pela padronização.

- Confirmando os resultados obtidos pela ACP, a análise de cluster, frequentemente aplicada em análises ambientais, foi realizada. Esta é uma ferramenta estatística muito útil na análise de dados em agrupamentos (clusters) esperados e não esperados, incluindo a presença de pontos fora de âmbito (outliers). Os pontos similares são agrupados, formando um cluster e o processo é repetido até que todos os pontos pertençam a um cluster. Esta análise examina a distância entre as amostras e os conjuntos de dados. O método Ward (método

da variância mínima) foi o método utilizado neste trabalho, por ter apresentado os melhores resultados. O método Ward incorpora um objeto a um grupo se essa união proporcionar a menor variância no sistema (Hortellani et al., 2008).

6.2. Etapa 2: Análise preliminar do teor de metais em tecidos de *C. danae*

Foram utilizados dez indivíduos da espécie *C. danae* provenientes de coleta realizada na região próxima ao rio Mariana (23° 57,521'S, 46°25,073'W), no canal de São Vicente (FIG. 4).

FIGURA 4: Estuário de Santos. O ponto em amarelo indica o local de coleta com rede de arrasto, a qual também contemplou indivíduos da espécie *C. danae* (Fonte: Google Earth).

A identificação destes organismos foi feita de acordo com Melo (1996). Os siris foram mensurados quanto a peso total, largura (desconsiderando os espinhos) e comprimento da carapaça (FIG. 5a). O sexo foi identificado segundo Willians (1974) e estágio de maturação de acordo com a forma e o grau de aderência do abdome aos esternitos torácicos (FIG. 5 b, c, d). Os indivíduos foram congelados a -20°C.

FIGURA 5: *C. danae*, com indicações de largura sem espinhos (LC) e comprimento (CC) da carapaça (a); sexo e estágio de maturação conforme forma e aderência do abdome (b=macho, com abdome em T; c= fêmea imatura, com abdome triangular; d=fêmea madura, com abdome oval).

Antes da manipulação dos indivíduos, a capela de exaustão foi limpa com detergente e água, com posterior aplicação de álcool 70 %. Foi instalado papel *contact* transparente nas paredes da capela e sua superfície foi limpa com HNO_3 10%, para evitar contaminação. Após descongelamento das amostras, brânquias, músculos e hepatopâncreas dos siris foram acessados, abrindo suas carapaças a partir de seus abdomes (FIG. 6 a, b, c).

Os tecidos foram retirados utilizando-se pinça cirúrgica (FIG. 6 d, e). As partes foram separadas em pequenas embalagens tipo zip lock (FIG. 6 f), identificando o número do indivíduo e a letra inicial do tecido correspondente (B, H ou M) com papel vegetal.

FIGURA 6: Dissecação de *C. danae* e separação dos tecidos

Para o processo de digestão ácida, foram pesados 0,5-1,0 g de cada tecido e 0,5g de materiais de referência certificados diretamente nos tubos de Teflon de microondas, já devidamente descontaminados. Baseado no método 3052 (U.S.EPA, 1996), foram adicionados aos tecidos 5 mL de HNO₃ sub boiling (65%) e 3 mL de H₂O₂ (30%). Os tubos de Teflon foram tampados, deixando os tecidos pré-digerindo de um dia para o outro (aproximadamente 8h). Após este período, adicionou-se aos tubos 2 mL de água tipo Milli-Q, a 18 MΩ.cm em 25 °C.

A digestão das amostras foi realizada em sistema de microondas (CEM Corporation, modelo MARS 5). Após digestão, os tubos foram colocados na capela de exaustão até total resfriamento. Após resfriamento, os extratos dos tubos de Teflon foram transferidos para tubos tipo Falcon, em balança analítica. Água Milli-Q foi adicionada aos extratos até atingir 20 g, alcançando uma acidez aproximada de 25%.

Após serem lavados em água corrente, os tubos de Teflon foram lavados três vezes com água Milli-Q para a descontaminação. As tampas e as roscas de segurança foram imersas em água Milli-Q. A secagem dos tubos ocorreu em capela, na temperatura ambiente. As tampas e roscas de segurança foram secas em ar comprimido. Adicionou-se de 10-15 mL de HNO₃ 10% nos tubos de Teflon secos, os quais foram colocados no sistema de microondas para limpeza. Ao final deste procedimento, os tubos foram colocados na capela até total resfriamento. Após resfriamento, transferiu-se o ácido para frascos de plástico de descarte. Os tubos foram novamente lavados em água Milli-Q. As tampas e roscas de segurança foram imersas em água Milli-Q. Os tubos, tampas e roscas de segurança foram secos em capela. Em alguns casos, fez-se uso de ar comprimido para secar tampas e roscas.

Na análise química dos tecidos de siri, foram mensurados os seguintes metais: Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb e Zn.

Os elementos Al, Cd, Cr, Co, Ni e Pb foram mensurados por meio de um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado (HR-ICPMS), marca Thermo Finnigan, modelo Element 1. Os elementos Cu, Fe e Zn foram analisados por meio de um espectrômetro de absorção atômica de chama “fast sequential” (AAS) marca Varian, modelo Spectr-

AAS-220-FS. O elemento Hg foi analisado utilizando-se CV AAS, acoplado a um sistema de injeção em fluxo com geração de vapor frio (FIA).

As amostras foram analisadas no AAS em sua diluição original (aproximadamente 25% de acidez, como anteriormente descrito). Já para análise em HR-ICPMS, foi retirada uma massa de 1g da diluição original e completou-se o volume até 10g com água Milli-Q, atingindo uma acidez de cerca de 2,5%. Os brancos (sete, no total) foram submetidos aos mesmos procedimentos, contendo apenas ácido, água oxigenada e água Milli-Q, sem nenhuma amostra.

A validação deste método foi feita analisando-se materiais de referência certificados (Oyster tissue – NIST SRM 1566^a; Lobster hepatopancreas – NRC TORT-2).

O limite de detecção (LD) para cada metal foi calculado de acordo com a equação descrita em INMETRO (2011):

$$\text{LD} = \text{média} + t_{(n-1; 1-\alpha)} \times \text{DP}$$

Média = média de concentrações medidas em 7 brancos

t = valor de t de Student de acordo com os graus de liberdade (n-1) e $\alpha = 0,05$

DP = desvio padrão das concentrações medidas em 7 brancos

Numa avaliação toxicológica preliminar, as concentrações de metais obtidas foram comparadas aos limites máximos de contaminantes inorgânicos em crustáceos segundo o Decreto no 55.871, de 26 de março de 1965 (Brasil, 1965); a Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998 (Brasil, 1998); a Resolução - RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013 (que revogou os limites máximos de Cd, Pb e Hg que constam no anexo da referida portaria) (Brasil, 2013) e o regulamento nº 1881/2006 da União Europeia (European Union, 2006). De modo a detectar relações entre os tipos de tecido e essas concentrações, foi realizada a análise de componentes principais (APC) utilizando o programa STATISTICA12 (Statsoft). Antes desta análise, os dados de concentrações de metais nas brânquias, hepatopâncreas e músculos foram padronizados, como anteriormente descrito.

6.3. Etapa 3: Análise de assinaturas químicas: tecidos de siri *C. danae* e sedimento

Em agosto/2011 e dezembro/2011, foram coletados 6-10 indivíduos da espécie *C. danae* em nove pontos de coleta, distribuídos em três áreas ao longo do estuário de Santos (TAB. 1).

Foram selecionados pontos na região do canal de São Vicente (área 1- BRC, MAR, PIA), na região próxima ao polo de Cubatão (área 2-COS, QUI, MOG) e no canal de Santos (área 3 - PCI, TGA, SCN) (FIG. 7) com base em informações prévias quanto à circulação (Harari e Camargo, 1998), abrangendo toda a região do estuário. A seleção da área 2 foi baseada também nos resultados de Bordon et al. (2011), que evidenciaram uma similaridade maior entre os pontos próximos ao polo de Cubatão. As áreas 1 e 3 foram selecionadas conforme seu posicionamento geográfico em relação a ilha de Santos e São Vicente e devido à intensa atividade portuária no canal de Santos.

TABELA 1: Áreas delimitadas para o estudo e seus respectivos pontos de coleta, com coordenadas geográficas.

Área 1 - canal de São Vicente			
Descrição	Sigla	Latitude	Longitude
Rio Branco	BRC	23°56,093' S	046°27,832' W
Rio Mariana	MAR	23°57,006' S	046°25,939' W
Rio Piaçabuçu	PIA	23°58,592' S	046°25,534' W
Área 2 – região próxima ao Polo de Cubatão			
Descrição	Sigla	Latitude	Longitude
Bacia de evolução Cosipa / Ultrafértil	COS	23°52,636' S	046°22,602' W
Rio Quilombo	QUI	23°53,059' S	046°22,056' W
Foz do Rio Mogi	MOG	23°53,965' S	046°23,052' W
Área 3 - canal de Santos			
Descrição	Sigla	Latitude	Longitude
Ilha dos Bagres / Largo do Canéu	PCI	23°54,954' S	046°20,353' W
Torre Grande	TGA	23°57,157' S	046°18,303' W
Santa Cruz dos Navegantes,	SCN	23°59,709' S	046°18,213' W

FIGURA 7: Estuário de Santos. Os pontos em amarelo indicam os locais de coleta de indivíduos da espécie *C. danae* e de sedimento (Fonte: Google Earth).

Amostras de sedimentos também foram coletadas (em triplicata) nos mesmos pontos de coleta de siri, por meio de draga tipo Van Veen. Todas as amostras foram congeladas a -20°C .

A identificação dos siris foi feita de acordo com Melo (1996). Os siris foram mensurados quanto ao peso total, largura (desconsiderando os espinhos) e comprimento da carapaça (FIG. 5a). O sexo foi identificado segundo Willians (1974) e o estágio de maturação, de acordo com a forma e o grau de aderência do abdome aos esternitos torácicos (FIG. 5b, c, d).

Para manipulação e dissecação dos siris, foram repetidos os procedimentos realizados na análise preliminar do teor de metais em tecidos de *C. danae*, submetendo brânquias, hepatopâncreas e músculos ao processo de digestão ácida, separadamente (item 6.2).

Após serem secas em temperatura ambiente e peneiradas em malha 2mm (para análise da porção total), as amostras de sedimento foram submetidas à digestão ácida para posterior análise das concentrações de metais (item 6.1).

Na análise química, foram mensurados os seguintes metais: Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn.

A validação dos métodos foi realizada através por meio da análise de materiais de referência certificados: Oyster tissue (NIST SRM 1566^a), Lobster hepatopancreas (NRC TORT-2) e Buffalo River sediment (NIST SRM 2704 e NIST SRM 8704- para Cd).

Na análise preliminar do teor de metais em tecidos de *C. danae*, observou-se baixa recuperação de Cr nos materiais certificados, assim como a formação de muito particulado após digestão das amostras, onde poderiam estar retidos os metais de interesse. Assim sendo e para aprimoramento dos resultados, uma nova metodologia de digestão foi aplicada segundo Lima et al.(2005). Pesou-se entre 0,5-1,0 g de cada tecido e 0,75g de material de referência certificado em papel manteiga (com exceção das brânquias, que foram inseridas utilizando-se de pinça). As amostras foram transferidas para balões de vidro, nos quais foram adicionados 2 mL de H₂SO₄, 1 mL de HNO₃ e 1 mL de HClO₄. A mistura foi aquecida a 110 °C durante 30 minutos. Após resfriamento, a mistura foi diluída em 20 g de água Milli-Q (atingindo uma acidez de 20%) e transferida para frascos tipo Falcon.

Como procedimento de descontaminação, após lavagem em água corrente e detergente comum, os balões permaneceram preenchidos de Extran 5% por 24 horas. Após este período, o Extran foi retirado. Os balões foram lavados com água desmineralizada e em seguida preenchidos com ácido nítrico 10%, assim permanecendo por 24 horas. Então, o ácido foi retirado e os balões novamente foram lavados com água desmineralizada. Em seguida, permaneceram por cerca de 1 hora em estufa a 70°C, sendo então retirados para uso imediato.

A digestão das amostras de sedimento foi realizada conforme previamente descrito na avaliação preliminar do sedimento (item 6.1).

Nas amostras de tecido de siris, os elementos Al, Cd, Cr, Co, Ni e Pb foram mensurados por meio de um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado (HR-ICPMS), marca Thermo Finnigan (modelo Element 1), do Laboratório de Caracterização Química e Isotópica; e de um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio (ICP OES) marca Spectro, do Laboratório de Análises Química e Ambiental, ambos

localizados no Centro de Química e Meio Ambiente- CQMA/IPEN-SP. Os elementos Cu, Fe e Zn foram analisados por meio de um espectrômetro de absorção atômica de chama “fast sequential” (AAS) marca Varian, modelo Spectr-AAS-220-FS, também localizado no Laboratório de Caracterização Química e Isotópica. O elemento Hg foi analisado utilizando-se CV AAS, acoplado a um sistema de injeção em fluxo com geração de vapor frio (FIA). As amostras foram analisadas no AAS e no ICP OES e sua acidez original (cerca de 20%). Já para HR-ICPMS, foi retirada uma massa de 1 g da diluição original e completou-se o volume até 10 g com água Milli-Q, atingindo uma acidez de aproximadamente 2%.

Nas amostras de sedimento, o elemento Cd foi mensurado por meio do HR-ICPMS e por um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) marca Perkin Elmer (modelo AAnalyst 800), do Laboratório de Absorção Atômica do LAN/IPEN-SP. Os elementos Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram analisados por meio do AAS do Laboratório de Caracterização Química e Isotópica. Nas amostras de sedimento, o elemento Hg também foi analisado utilizando-se CV AAS, acoplado a um sistema de injeção em fluxo com geração de vapor frio (FIA). Para medir as concentrações de Al e Fe, os extratos das amostras de sedimento foram diluídos em 100 vezes antes da determinação. Para os demais metais, os extratos foram analisados em sua acidez original (30%).

O limite de detecção (LD) para cada metal foi calculado de acordo com a equação descrita em INMETRO (2011):

$$\text{LD} = \text{média} + t_{(n-1; 1-\alpha)} \times \text{DP}$$

Média = média de concentrações medidas em 7 brancos

t = valor de t de Student de acordo com os graus de liberdade (n-1) e $\alpha = 0,05$

DP = desvio padrão das concentrações medidas em 7 brancos

Posteriormente ao experimento acima descrito, foram coletados 7 indivíduos de Ilha Grande, RJ e 9 indivíduos do estuário de Santos, SP (FIG.8) em março/2013. Estes siris foram dissecados e tiveram seus tecidos analisados de forma a validar o modelo de identificação de assinaturas químicas estabelecido

com as amostras de agosto e dezembro/2011. O processo de digestão e a análise de metais dessas amostras foram conduzidos na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

FIGURA 8: Localização do estuário de Santos, SP (amarelo) e de Ilha Grande, RJ (vermelho) (Fonte: Google Earth).

A validação do método analítico foi realizada por meio da análise de material de referência certificado de músculo de peixe (NRC-DORM-3).

Para a digestão, foram pesados em torno de 250 mg de tecidos de siris (brânquias, hepatopâncreas e músculos, separadamente) ou material de referência certificado. Adicionou-se 2,5 mL de HNO₃ bidestilado (Merck, Alemanha), deixando as amostras em pré-digestão por aproximadamente 12 horas. Em seguida, as amostras foram aquecidas em chapa aquecedora (80- 100 ° C). Após resfriamento, os extratos foram avolumados até 25 mL com água ultrapura. As amostras foram então diluídas 100 vezes para análise em um ICPMS, modelo Perkin Elmer (modelo Enxio 300X), usando ¹⁰³Rh como padrão interno em concentração de 40 ug/L em solução aquosa. O limite de detecção foi calculado segundo a seguinte equação:

$$LD = [(3SD)/slope] \times \text{fator de diluição da amostra}$$

slope = coeficiente angular da curva analítica; SD= média dos desvios padrões de 10 sinais (de um dado elemento) fornecidos pelo equipamento.

A interpretação de dados foi realizada por meio de análises estatísticas, realizadas utilizando-se o software STATISTICA 12 (Statsoft).

Primeiramente, os dados de concentração de metais nos tecidos foram avaliados quanto a sua significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Este teste não-paramétrico é utilizado quando a distribuição de dados não segue a normalidade (homogeneidade) e não se observa igualdade de variâncias (homocedasticidade). Assim, como uma alternativa à ANOVA na comparação de médias, utiliza-se o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis para verificação da similaridade de medianas (também utilizando-se para verificação da significância o valor de $p \leq 0,05$).

Posteriormente, a análise discriminante canônica foi aplicada para avaliar a separação dos dados obtidos por tipo de tecido, período e área de coleta. Esta técnica de dependência multivariada é aplicada quando a variável dependente é categórica (nominal ou não métrica) e as variáveis independentes são métricas. Após a definição dos grupos, são coletados dados individuais dos elementos de cada grupo. A análise discriminante procura estimar a combinação linear das características individuais de cada elemento que melhor discrimina entre os grupos pré-estabelecidos. Outra vantagem da análise discriminante é reduzir o espaço dimensional das variáveis independentes para $G-1$ dimensões, onde G é o número de grupos estabelecidos a priori. É utilizada também para classificar novos elementos dentro de um dos grupos. A seleção das variáveis independentes para construir um modelo é feita passo a passo. Desse modo, todas as variáveis não selecionadas são avaliadas para se conhecer qual contribuiu mais para a separação entre os grupos e então são incluídas no modelo (Bona, 2006).

Seguindo o manual do STATISTICA 12, as variáveis (metais) foram inseridas uma de cada vez no modelo de função discriminante (*Forward stepwise*), sempre levando em consideração a variável com a contribuição mais significativa para a discriminação. O Wilks' Lambda é a estatística padrão utilizada para avaliar o poder de discriminação do modelo. Esta estatística varia de 0 (perfeito poder discriminatório) a 1 (nenhum poder discriminatório). Há os Wilks' Lambdas parciais, cuja idéia é a mesma do Lambda global: medir a significância da variável em questão para discriminar os grupos (pontos ou área de coleta). O

Wilks' Lambda pode ser convertido em um valor da estatística F com o correspondente valor de p (p-value).

Após esta etapa, foi realizada a análise canônica. As diferentes funções discriminantes e independentes foram calculadas pelo programa e inseridas para verificar como as variáveis discriminaram-se entre os diferentes grupos. Cada função foi sucessivamente contribuindo menos para o poder de discriminação.

Para avaliar a significância de cada uma das funções, foi calculado o valor de *Chi quadrado* e seu respectivo valor de p. O número máximo de funções estimadas é o número de variáveis (ou o número de grupos – o que for menor) menos um. Por exemplo, se há quatro variáveis e três grupos, portanto duas funções são estimadas.

Após esta avaliação, fez-se a verificação dos coeficientes padronizados das variáveis canônicas. Dessa forma, avaliou-se quais as variáveis (metais) que puderam mais fortemente cada uma das funções discriminantes. Os autovalores estão relacionados à proporção da variância explicada por cada função. Como parâmetro para a verificação da significância, foram consideradas para estudo apenas aquelas funções discriminantes que apresentaram autovalores ≥ 1 e variância individual acima de 10%. Também foram calculadas as médias das variáveis canônicas de modo a determinar quais funções separaram melhor os grupos em estudo (pontos ou áreas de coleta).

Quando gerados gráficos de dispersão com os dados canônicos, foram inseridas elipses de confiabilidade de 95%. Essas elipses foram geradas conforme o alcance das variáveis canônicas. Nesta abordagem, é produzida uma elipse de tamanho fixo de modo que o comprimento da sua projeção horizontal e vertical nos eixos x e y (respectivamente) seja igual a média $\pm$ (intervalo* I), onde a média e o intervalo referem-se a variável X ou Y, e I é o coeficiente que controla a elipse (0,95).

A aplicação desta análise teve como principais objetivos: 1- confirmar a separação dos tipos de tecido em função da acumulação diferenciada dos metais; 2- verificar indícios para inferir possíveis relações dos dados obtidos para algum dos tecidos de *C. danae* com o conteúdo de metais adsorvido ao sedimento; 3-

identificar uma assinatura química para o estuário de Santos com os dados de tecidos e sedimentos; 4- validar temporal e espacialmente o modelo estabelecido; 5- realizar simulações para verificar a sensibilidade do modelo; 6- investigar as alterações na assinatura química em função da influência das atividades de fontes emissoras de metais próximas às áreas de coleta; 7- verificar a estabilidade do modelo na análise por área de coleta.

A identificação de evidências das atividades de fontes emissoras conhecidas do estuário por área de coleta foi realizada baseando-se nos dados de efluentes fornecidos pelo relatório CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Etapa 1

Segundo a avaliação do material de referência, a recuperação para a maioria dos metais foi > 80%. Buffalo River sediment é um material certificado para a concentração total dos metais, o que explica a baixa recuperação de Cr (52,1%) e Al (27,3%) (TAB. 2).

Entretanto, no documento referente ao método 3051A, existem dados de recuperação para amostras de Buffalo River sediment digeridas pelo método (TAB.2) de modo a validá-lo. Comparando os dados obtidos neste trabalho com esta validação, a recuperação do Cr atingiu 91%. Esse resultado foi considerado adequado para Cr, assim como para as recuperações Cd, Ni e Pb.

TABELA 2: Concentrações de metais obtidas nas análises do material de referência Buffalo River sediment, valores certificados, recuperação (em %), validação do método de digestão para Buffalo River sediment apresentada no método 3051A e recuperação (em %) segundo esta validação.

Metal	Valor Obtido	Buffalo River sediment (NIST SRM 2704)			
		Valor Certificado	Rec. (%)	Valor Certificado (USEPA 3051A)	Rec. (%)
Al	1,7±0,5	6,11±0,16	27	-	-
Cd	3,00±0,04	3,45±0,22	85	3,62 ± 0,17	82
Co	15,7±2,1	14±0,6	112	-	-
Cr	70,5±6,5	135±5	52	77,1 ± 12,6	91
Cu	90,6±3,8	98,6±5	91	-	-
Fe	3,43±0,03	4,11±0,10	83	-	-
Hg	1,65±0,04	1,47±0,07	112	-	-
Mn	516±11	555±19	93	-	-
Ni	36±2	44,1±3	80	42,2 ± 3,2	85
Pb	150±12	161±17	93	161 ± 17	93
Zn	431±34	438±12	98	-	-

- não há valor certificado

Os elementos Al e Cr são conhecidos como elementos refratários, fortemente ligados a silicatos que são difíceis de digerir, o que também explica a baixa recuperação destes metais. Estes resultados estão de acordo com outros estudos (Cook, et al.1997; Cox et al., 2003; Hortellani et al., 2008).

As concentrações dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$), o percentual de silte-argila, COT e os valores de TEL e PEL são apresentados na TAB. 3.

TABELA 3: Concentrações dos metais, percentual de silte-argila e COT das amostras de sedimento do sistema estuarino de Santos (n=16). Valores acima de TEL estão em negrito e valores acima de PEL estão em negrito e sublinhado.

Pontos	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$	Silte- argila %	COT %
1	1,06	0,08	13,1	15,8	14,0	1,20	0,20	212	5,2	13,4	54	4,51	1,90
2	0,56	0,05	6,4	2,8	1,0	0,58	0,14	78	<LD	1,3	20	1,46	2,20
3	1,22	0,10	10,7	7,2	5,4	1,12	0,20	91	5,8	6,5	39	3,23	5,43
4	1,15	0,11	14,5	9,2	7,4	1,59	0,34	168	5,5	7,0	59	3,68	2,40
5	4,59	0,27	33,0	29,5	27,7	3,87	<u>1,33</u>	255	21,5	24,7	114	36,65	4,20
6	0,95	0,10	11,4	5,9	4,1	1,64	0,19	136	6,4	3,1	42	10,67	7,79
7	0,48	0,07	10,5	6,8	5,0	0,85	0,15	93	1,0	5,5	26	0,00	5,67
8	0,77	0,05	8,1	3,8	2,0	0,81	0,19	104	2,7	3,7	32	0,71	1,19
9	1,54	0,05	19,2	7,2	5,4	1,95	0,16	366	7,6	1,0	40	5,96	1,33
10	1,22	0,04	15,8	15,0	12,0	1,58	<LD	160	9,6	4,4	51	0,78	0,43
11	3,58	0,09	36,0	19,0	17,0	3,35	0,18	889	17,4	15,0	95	8,61	1,58
12	3,63	0,23	30,8	35,4	20,1	3,45	0,55	316	23,5	18,3	180	16,53	5,00
13	3,71	0,34	42,5	38,3	16,5	3,99	0,42	593	23,6	37,7	231	15,54	4,86
14	1,36	0,06	12,5	6,4	9,5	1,45	0,03	165	5,5	3,7	46	1,17	2,65
15	3,99	0,29	41,3	27,5	13,5	3,59	0,57	610	17,0	26,6	143	10,18	3,02
16	1,52	0,06	13,9	6,9	6,5	1,32	<LD	115	3,5	6,9	39	0,77	2,62
TEL	x	0,70	52,3	18,7	x	x	0,13	X	15,9	30,2	124	x	X
PEL	x	4,21	160,0	108,0	x	x	0,70	x	42,8	112,0	271	x	X

* não há valor; LD=Limite de detecção

As concentrações de Hg apresentaram-se acima de TEL na maioria dos pontos (com exceção dos pontos 10, 14 e 16: Petrobrás 1, COSIPA-3, rio Casqueiro, respectivamente), variando entre $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ (ponto 14: COSIPA-3) e $0,55 \mu\text{g g}^{-1}$ (ponto 12: Petrobrás-3). O ponto 5 (deságue do rio Cubatão) apresentou o único valor acima do PEL neste estudo. Esses resultados estão na mesma ordem de grandeza daqueles encontradas por outros estudos no mesmo estuário (Lamparelli et al., 2001; Cesar et al., 2007; Hortellani et al., 2008).

As concentrações de Cu e Ni nos pontos 5 (deságue do rio Cubatão), 11, 12 (Petrobrás 2 e 3, respectivamente), 13 e 15 (COSIPA 2 e 4) apresentaram-se acima de TEL; a concentração de Zn esteve acima de TEL nos pontos 12 (Petrobrás-3), 13 e 15 (COSIPA 2 e 4) e a concentração de Pb esteve acima de TEL apenas no ponto 13 (COSIPA-2).

Estes resultados foram obtidos provavelmente em função de efluentes industriais, uma vez que estes pontos estão perto de várias indústrias localizadas no Rio Cubatão e no canal de Piaçaguera. Lamparelli et al. (2001) também notou a relação da presença desses metais nos sedimentos com processos industriais. Aparentemente, o ponto 5 (deságue do rio Cubatão) também é influenciado por estes efluentes industriais, uma vez que está localizado na parte final do rio Cubatão e apresentou concentrações acima do valor orientador TEL para os metais citados (Cu, Hg e Ni).

As concentrações de Mn estiveram de acordo com os valores encontrados em estudos anteriores (Lamparelli et al., 2001; Luiz-Silva et al. 2006). As concentrações encontradas de Cd estiveram muito abaixo dos limites canadenses e a concentração de Co para alguns pontos (5 e 12: deságue do rio Cubatão e Petrobrás-3, respectivamente) estiveram acima dos encontrados em outros estudos (Luiz-Silva et al. 2006; Hortellani et al. 2008).

O percentual de silte-argila nos pontos 5 (deságue do rio Cubatão), 6, 12, 13 e 15 (pontos próximos à COSIPA, indústria siderúrgica) foi elevado quando comparado aos outros pontos. Sabe-se que a concentração de metais aumenta inversamente ao tamanho do grão (com consequente aumento na área superficial disponível do grão) (Hortellani et al., 2005). Assim, os resultados obtidos para o

percentual de silte-argila confirmaram as características favoráveis que promoveram as elevadas concentrações de metais nestes pontos, principalmente de Hg.

Neste trabalho, o percentual de silte-argila no ponto 14 foi bem menor quando comparado aos observados nos pontos 13 e 15, os quais não são distantes do ponto 14 (todos na região COSIPA). O que pode ter motivado este resultado foi o lançamento da draga, que pode ter ocorrido em pontos onde o percentual de silte-argila estava baixo. Em função da dinâmica estuarina, o conteúdo de sedimento superficial pode variar mesmo em áreas próximas. Cesar et al.(2007) também observou baixo percentual de silte-argila na mesma região de estudo, utilizando um método granulométrico similar. Luiz-Silva et al. (2006) observou variação considerável nos dados granulométricos, até na mesma estação de coleta.

O COT variou de 0,43 (ponto 10:Petrobrás-1) a 7,79% (ponto 6: COSIPA-1). De acordo com U.S.EPA (2005), em vários estudos prévios que avaliaram a disponibilidade de metais em areia e silte-argila, os valores de COT acima de 0,5% foram responsáveis pela maior parte da precipitação de metais. Ou seja, a disponibilidade de metais à biota é também influenciada pela porcentagem de COT. Comparando os valores de COT com o conteúdo de silte-argila, não há um padrão aparente de distribuição entre os dois parâmetros. Segundo Yu et al.(2001), diferentes variáveis podem competir dinamicamente para adsorver metais, tornando difícil a compreensão da adsorção e processo de liberação de metais.

De modo a identificar alguma relação entre as variáveis de estudo, foi utilizada como ferramenta estatística uma matriz de correlação com os dados de concentração de metais, percentual de silte-argila e COT. Os coeficientes de Pearson são apresentados na TAB. 4. O percentual de silte-argila apresentou elevada correlação ($p < 0,01$) com todos os metais com exceção do Mn ($p > 0,05$). A correlação entre Hg e o percentual de silte-argila foi a maior entre os metais, o que corrobora com Hortellani et al.(2005). Al e Fe, comumente usados para a normalização, apresentaram correlações significativas com os outros metais. Todos os metais e o percentual de silte-argila não apresentaram correlação

significativa com COT ($p > 0,05$). Em geral, exceto por Hg e Mn, todos os metais mostraram-se fortemente correlacionados, o que sugere uma disseminação generalizada destes metais no sistema estuarino de Santos.

TABELA 4: Correlação de Pearson para os metais, percentual de silte-argila e COT analisados em amostras de sedimento ($n=16$) do sistema estuarino de Santos.

	Al	Cd	Cr	Cu	Co	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn	Silte-argila	COT
Al	1												
Cd	0,8431 ^a	1											
Cr	0,9483 ^a	0,8459 ^a	1										
Cu	0,8867 ^a	0,8955 ^a	0,8961 ^a	1									
Co	0,8658 ^a	0,6903 ^a	0,7696 ^a	0,8586 ^a	1								
Fe	0,9737 ^a	0,8612 ^a	0,9720 ^a	0,9111 ^a	0,8388 ^a	1							
Hg	0,7464 ^a	0,7479 ^a	0,5852 ^b	0,6562 ^a	0,7500 ^a	0,6894 ^a	1						
Mn	0,7322 ^a	0,5031 ^b	0,8544 ^a	0,6127 ^b	0,5198 ^b	0,7717 ^a	0,220 ^{Ns}	1					
Ni	0,9460 ^a	0,8489 ^a	0,9257 ^a	0,9517 ^a	0,8617 ^a	0,9700 ^a	0,6739 ^a	0,6967 ^a	1				
Pb	0,8529 ^a	0,9391 ^a	0,8919 ^a	0,9235 ^a	0,7534 ^a	0,8638 ^a	0,6439 ^a	0,6377 ^a	0,8497 ^a	1			
Zn	0,8404 ^a	0,9133 ^a	0,8912 ^a	0,9572 ^a	0,7144 ^a	0,8916 ^a	0,5418 ^b	0,6421 ^a	0,9212 ^a	0,9217 ^a	1		
Silte-argila	0,8039 ^a	0,7501 ^a	0,6557 ^a	0,7183 ^a	0,8152 ^a	0,7856 ^a	0,9339 ^a	0,332 ^{Ns}	0,7825 ^a	0,6706 ^a	0,6205 ^a	1	
COT	0,110 ^{Ns}	0,389 ^{Ns}	0,075 ^{Ns}	0,1817 ^{Ns}	0,0539 ^a	0,166 ^{Ns}	0,260 ^{Ns}	-0,135 ^{Ns}	0,1734 ^{Ns}	0,216 ^{Ns}	0,238 ^{Ns}	0,346 ^{Ns}	1

^a Correlação significativa ($p < 0,01$);

^b Correlação significativa ($p < 0,05$);

^{Ns} Correlação não-significante ($p > 0,05$)

Prosseguindo com a análise estatística e a fim de identificar prováveis grupos de variáveis correlacionadas (e não identificadas apenas pela realização da correlação de Pearson), foi aplicada a análise de componentes principais (ACP).

Neste estudo, ACP indicou que 13 variáveis e 16 amostras de sedimento podem ser representadas por três CP (componentes principais – CP), as quais foram consideradas significativas já que apresentaram variância individual acima ou próxima de 10% e autovalor acima ou próximo de 1. Estas CP representam juntas 92,85% da variância total dos dados originais.

A CP1 concentrou informações a respeito de todos os metais e o percentual de silte-argila. As correlações entre CP1 e cada metal e o percentual de silte-argila são apresentados: Al (0,968), Cd (0,922), Cr (0,949), Cu (0,958), Co (0,874), Fe (0,978), Hg (0,760), Mn (0,691), Ni (0,9714), Pb (0,928), Zn (0,922),

silte-argila (0,825). Essas correlações elevadas foram observadas devido à predominância de CP1, que explicou cerca de 75% da variância total. A CP2 (correspondendo a 11.03% da variância) somente apresentou informações sobre COT, Mn, Hg, e silte-argila. Estes parâmetros apresentaram os seguintes valores de correlação com CP2: COT (0,756), Mn (- 0,598), Hg (0,447), silte-argila (0,411). Já CP3, a menos significativa das componentes, apresentou informações apenas sobre COT (0,551) e Hg (-0,408). Os gráficos de CP1 *versus* CP2 e CP1 *versus* CP3 são apresentados nas FIG. 9a,b e c.

FIGURA 9: Gráficos com as amostras de sedimentos dos 16 pontos de coleta em função das coordenadas dos 3 componentes principais mais significativos (a = CP1xCP2, b= CP1xCP3 com os 16 pontos, c= CP1xCP2 com os metais mensurados). Legenda: Mud = silte-argila; TOC = Carbono Orgânico Total - COT).

Os pontos 5 (deságue do rio Cubatão), 11, 12 (Petrobrás 2 e 3, respectivamente) 13, 15 (COSIPA 2 e 4, respectivamente) apresentaram-se separados dos demais pontos nos gráficos. Conforme anteriormente citado, o ponto 5 apresentou concentração de Hg > PEL e foi separado de outros pontos na FIG. 9b pois Hg foi o único elemento que apresentou correlação negativa com CP3. Ressalta-se que as concentrações de Cu e Ni nos pontos 11, 12, 13 e 15 apresentaram-se acima de TEL; a concentração de Zn esteve acima de TEL nos pontos 12, 13 e 15 e a concentração de Pb foi superior a TEL apenas no ponto 13. Os pontos 5, 12, 13 e 15 foram agrupados, sugerindo que estes devem ser os pontos mais contaminados deste estudo, justificando os resultados da ACP. O ponto 11 também apresentou concentrações de Cu, Hg e Ni acima de TEL. Entretanto, o que motivou a separação deste ponto dos demais na FIG. 9a foi a elevada concentração de Mn encontrada neste ponto e o fato de Mn ter apresentado correlação significativa com CP2 (-0,598).

Entre os pontos menos contaminados, um subgrupo incluindo os pontos 3 (Largo da Pompeba), 6 (COSIPA-1) e 7 (deságue do rio Bertioga) foi separado dos demais devido ao fato de ter apresentado valores para COT >5,0 %, o que pode interferir na disponibilidade de metais para biota (NOAA, 1995; Yu et al., 2001).

Um grupo formado por Al, Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn; outro formado por Hg e silte-argila e um último formado apenas pelo Mn foram explicados pela CP1 (FIG. 9c), confirmando mais uma vez a influência das atividades industriais. Por outro lado, CP2 também explicou o grupo formado por Hg e silte-argila; e Mn apresentou correção significativa com CP2. Novamente, Hg e silte-argila apresentaram-se relacionados (FIG. 9c), não só pela contaminação em si (já que Hg se mostrou acima de valores da legislação canadense), mas também por causa da alta capacidade da silte-argila em adsorver Hg.

De modo a confirmar os resultados obtidos pela ACP, a análise de Cluster foi realizada.

Um dendograma relativo à similaridade das amostras é apresentado na FIG. 10. Os ramos horizontais correspondem aos pontos de coleta e os números no topo da figura indicam o índice de dissimilaridade, numa escala de 0

(identidade) a 25 (máxima dissimilaridade entre esses pontos). Os pontos foram separados em 2 grupos (G1 e G2) devido a máxima dissimilaridade entre a composição química das amostras.

FIGURA 10: Dendrograma referente à análise de cluster para concentração de metais em sedimentos de superfície coletados em pontos distribuídos ao longo do estuário de Santos.

Na FIG. 10, também podemos verificar que G2, representado pelas amostras coletadas em pontos mais críticos em relação à contaminação, ainda pode ser dividido em dois subgrupos. Um deles, contendo os pontos 12, 13 e 15, os quais apresentaram os sedimentos com as concentrações muito acima dos outros pontos de coleta para os elementos Cu, Hg, Mn, Ni, Zn e Pb (a maioria acima do TEL); e outro subgrupo, contendo o ponto 5 separado pelo alto teor de Hg (o único valor acima do PEL) e o ponto 11 devido à alta concentração de Mn. Verificou-se, finalmente, que os resultados obtidos pela análise de cluster confirmaram os resultados obtidos pela ACP.

A caracterização desses grupos foi feita pela média e desvio padrão de cada um dos elementos analisados (TAB. 5). G2 (contendo 5 amostras) apresentou os elementos com concentração média de 3.09 a 3.95 vezes superiores aos elementos de G1 (contendo 11 amostras), sugerindo que G2 compreende as amostras de sedimentos mais críticas em relação à contaminação. Essas amostras de G2 foram coletadas em pontos localizados próximos às atividades industriais, enquanto que o G1 agrupa as amostras de sedimentos coletadas em pontos considerados como não contaminados.

TABELA 5: Caracterização dos grupos definidos pela composição química.

Elemento	G1 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) média±DP	G2 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) média±DP	G2/G1
Cu	8,1 ± 4,2	26,0 ± 11,7	3,21
Hg	0,16 ± 0,08	0,51 ± 0,45	3,15
Mn	152 ± 85	471 ± 273	3,09
Ni	4,9 ± 2,6	18,1 ± 6,8	3,63
Pb	5,3 ± 3,5	21,0 ± 11,5	3,95
Zn	40 ± 12	135 ± 65	3,32

7.2. Etapa 2

Os dados biométricos dos indivíduos analisados são apresentados na TAB. 6. Todos os indivíduos eram fêmeas, sendo que apenas os indivíduos 5 e 10 foram considerados imaturo (abdome triangular selado aos esternitos torácicos) e ovígera (abdome repleto de ovas), respectivamente. Os demais indivíduos foram considerados maduros (abdome oval flexível). O peso total variou de 11,7 g a 89,6 g, com média de $35,3 \pm 6,7$ g. Já o comprimento e a largura da carapaça apresentaram-se, respectivamente, nos intervalos de 28,3 a 49,4 mm e 50,0 a 85,2 mm, com médias de $38,0 \pm 1,9$ mm e $64,2 \pm 2,9$ mm. Acredita-se que a predominância de fêmeas na amostra analisada está diretamente ligada a proximidade do ponto de coleta da área marinha, em função do conhecido comportamento reprodutivo migratório das fêmeas (Barreto et al., 2006).

TABELA 6: Sexo, estágio de maturação (EM), peso total (PT), comprimento (CC) e largura (LC) da carapaça dos indivíduos analisados da espécie *C. danae* (n=10).

Nº	Sexo	EM	PT	CC(mm)	LC(mm)
1	F	M	30,0	38,8	64,1
2	F	M	21,1	34,1	56,6
3	F	M	25,9	31,2	61,0
4	F	M	27,0	35,6	61,0
5	F	I	11,7	28,3	50,0
6	F	M	47,5	42,1	71,1
7	F	M	31,6	42,9	63,8
8	F	M	34,8	38,8	64,3
9	F	M	33,9	38,6	65,0
10	F	O	89,6	49,4	85,2
Média	-	-	35,3	38,0	64,2
EP	-	-	6,7	1,9	2,9
Min.	-	-	11,7	28,3	50,0
Máx.	-	-	89,6	49,4	85,2

EP = Erro padrão: estimativa do desvio padrão da distribuição das médias de amostras com o mesmo tamanho obtidas da mesma população; Sexo: F= fêmea; Estágio de maturação (EM): M=maduro, I= imaturo, O=ovígera

Para assegurar a qualidade da metodologia analítica, os materiais de referência certificados foram analisados em triplicata. A recuperação para a maioria dos metais foi acima de 70% (TAB. 7). Considerando-se que a diluição das amostras para análise de Hg foi de cerca de 20 vezes, as concentrações obtidas nas replicatas de Oyster tissue ficaram abaixo do limite de detecção e a validação foi conduzida conforme os resultados de TORT-2. O elemento Cr apresentou as recuperações mais baixas deste estudo. De acordo com o método 3052 (U.S.EPA, 1996), Cr pode estar ligado fortemente a alguns componentes refratários da matriz que são capazes de sequestrar os metais de interesse, o que explica o resultado obtido. Os limites de detecção de cada metal são apresentados na TAB. 8.

TABELA 7: Concentrações de metais obtidas nas análises dos materiais de referência TORT-2 e Oyster tissue, valores certificados e recuperação (em %).

Lobster Hepatopancreas (TORT-2)										
Metal	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn
Média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	x	18,9	0,45	87	0,34	77	0,27	2,3	0,24	168
EP ^a	x	0,4	0,01	3	0,02	1	0,004	0,2	0,01	3
Conc. certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	x	26,7	0,51	106	0,77	105	0,27	2,5	0,35	180
Recuperação (%)	x	71	89	82	44	74	100	94	68	93
Oyster tissue (NIST SRM 1566a)										
Metal	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn
Média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	160,1	4,14	0,35	58,1	0,44	427	<LD	2,05	0,299	766
EP ^a	89,4	0,04	0,01	2,7	0,03	14,8	<LD	0,16	0,029	15
Conc. certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	202,5	4,15	0,57	66,3	1,43	539	0,064	2,25	0,371	830
Recuperação (%)	79	100	62	88	30	79	-	91	81	92

^a EP= Erro padrão; * Não há concentração certificada para este metal; LD=limite de detecção

TABELA 8: Limites de detecção (LD) para cada metal de interesse.

Metal	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	0,009 ^a
Cd	0,0001 ^a
Co	0,0001 ^a
Cu	0,062 ^b
Cr	0,0002 ^a
Fe	0,038 ^b
Hg	0,001 ^c
Ni	0,001 ^a
Pb	0,0001 ^a
Zn	0,043 ^b

a= HR-ICPMS; b= AAS; c=FIA

Os dados de concentração de metais no tecido muscular, branquial e no hepatopâncreas dos indivíduos analisados são apresentados na TAB. 9. As brânquias foram o tecido que apresentou os maiores valores médios de concentração para todos os metais, exceto Hg (mais elevado nos músculos) e Zn (mais elevado no hepatopâncreas).

TABELA 9: Concentração média, valores mínimos e máximos de metais nas brânquias, no hepatopâncreas e nos músculos (base úmida) dos indivíduos analisados de *C. danae* (n=10).

Brânquias $\mu\text{g g}^{-1}$										
	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Ni	Pb	Hg	Fe	Zn
média	1051,0	0,003	0,127	<LD	0,392	0,21	0,540	<LD	312	13,3
min	163,6	<LD	0,066	<LD	0,086	0,07	0,199	<LD	26	9,4
máx	2652,6	0,010	0,268	<LD	0,838	0,37	1,463	<LD	1057	20,1
Hepatopâncreas $\mu\text{g g}^{-1}$										
	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Ni	Pb	Hg	Fe	Zn
média	9,6	0,001	0,057	<LD	0,056	0,08	0,157	<LD	22	74,7
min	<LD	<LD	0,041	<LD	<LOD	0,02	0,091	<LD	12	30,9
máx	38,3	0,005	0,068	<LD	0,115	0,13	0,284	<LD	67	115,6
Músculos $\mu\text{g g}^{-1}$										
	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Ni	Pb	Hg	Fe	Zn
média	40,6	<LD	0,023	<LD	0,012	0,04	0,161	0,09	9	34,7
min	9,0	<LD	0,012	<LD	<LD	<LD	0,078	<LD	6	19,9
máx	87,9	<LD	0,037	<LD	0,050	0,16	0,479	0,14	17	45,5

LD= limite de detecção

Em uma revisão minuciosa da literatura, não foram encontradas publicações que avaliaram os teores de todos os metais em questão nos três tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculos) da espécie *C. danae*. Com relação às publicações existentes, os resultados obtidos para Cd, Cr, Cu, Pb e Zn estiveram abaixo do encontrados por Virga (2006), Virga et al. (2007) e Virga e Geraldo (2008) em tecidos moles de indivíduos do gênero *Callinectes* provenientes do Rio Cubatão. Harris e Santos (2000) também encontraram maior concentração de Zn no hepatopâncreas de *C. danae*, entretanto, as concentrações de Cu, Cd e Fe apresentaram-se maiores neste tecido que nos demais.

Segundo o Decreto no 55.871, de 26 de março de 1965 (Brasil, 1965), a Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998 (Brasil, 1998) e a Resolução - RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013 (Brasil, 2013), as quais estabelecem os limites máximos de tolerância para alguns contaminantes inorgânicos, os valores limítrofes de Cd, Cu, Cr, Hg, Pb e Zn em peixes e produtos de pesca e crustáceos

são, respectivamente: 0,5ppm; 30 ppm; 12 ppm; 0,5 ppm; 0,5 ppm e 50 ppm. Segundo o regulamento nº 1881/2006 da União Europeia (European Union, 2006), o teor máximo de Pb, Cd e Hg que pode estar presente para consumo em peso fresco de crustáceos é de 0,5ppm. Logo, numa abordagem toxicológica preliminar, apenas as concentrações de Pb nas brânquias e de Zn no hepatopâncreas estariam em desacordo com a legislação. Entretanto, o músculo (principal tecido consumido pelo homem) estaria em condições adequadas para consumo.

Para a análise de componentes principais, foram considerados todos os dados de concentração de metais por indivíduo, independente de seu estágio de desenvolvimento e maturação. Dessa forma, foi considerada toda a informação proveniente do ambiente, incluindo as variações intra-específicas que podem ocorrer na absorção de metais.

Os resultados indicaram que as 10 variáveis (metais) e as 30 amostras de tecido foram explicadas por duas componentes significantes (PC), as quais apresentaram variância acima ou próximo de 10% e autovalor acima ou próximo de 1. Estas PC apresentaram juntas 80% da variância total dos dados originais.

A PC1 concentrou informações sobre todos os metais, com exceção de Hg e Zn (cujas informações foram apresentadas por PC2). As correlações entre PC1 e cada metal foram: Al (0,947), Cd (0,802), Cr (0,963), Cu (0,648), Co (0,950), Fe (0,943), Ni (0,936), Pb (0,925). Já as correlações entre PC2 e Hg e Zn foram: Hg (0,916), Zn (-0,471). As FIG. 11a e b referem-se aos gráficos de PC1 *versus* PC2.

FIGURA 11: Gráficos com as amostras de músculos, brânquias e hepatopâncreas de siris em função das coordenadas das duas componentes principais mais significativas (a = PC1xPC2 com os dados de siris, b= PC1xPC2 com os metais mensurados).

Como observado na FIG. 11a, um grupo constituído por Al, Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb foi separado por PC1, metais que apresentaram maior concentração nas brânquias. Dois outros grupos, constituídos apenas por Hg e Zn (metais com concentrações maiores nos músculos e no hepatopâncreas, respectivamente) foram separados por PC2. O tipo de tecido foi identificado de acordo com os metais que se apresentaram em maiores concentrações (FIG. 11b).

7.3. Etapa 3

7.3.1. Dados biométricos das amostras de siris coletadas em agosto e dezembro/2011

Os dados biométricos das amostras de siris coletadas em agosto/2011 por ponto de coleta são apresentados na TAB. 10. No APÊNDICE A, são encontrados os dados biométricos por indivíduo deste período, incluindo sexo e estágio de maturação. Entre os 82 indivíduos analisados, 78 foram classificados como machos (abdome em forma de T), sendo 63 imaturos (abdome selado aos esternitos torácicos) e 15 maduros (abdome flexível). Foram encontradas quatro fêmeas, sendo uma imatura (abdome triangular selado aos esternitos torácicos) e três maduras (abdome oval flexível). O peso total variou de 19,9 g a 129,4 g, com média de $65,7 \pm 2,6$ g. Já o comprimento e a largura da carapaça apresentaram-se, respectivamente, nos intervalos de a 30,4mm a 62,3 mm e 55,2 a 104,6 mm, com médias de $46,5 \pm 0,6$ mm e 80 ± 1 mm.

TABELA 10: Dados biométricos por ponto de coleta e totais dos siris coletados em agosto/2011 (n=82).

Área	Ponto	LC (mm)			CC (MM)			Peso (g)		
		Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.	Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.	Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.
Área 1: Canal de S.Vicente	BRC	79,4 $\pm$ 1,2	74,1	87,3	47,5 $\pm$ 0,6	44,6	50,4	61,5 $\pm$ 3,2	43,9	77,2
	PIA	72,1 $\pm$ 2,8	55,2	85,6	40,4 $\pm$ 1,6	30,4	47,4	44,4 $\pm$ 5,5	19,9	73,4
	MAR	80,1 $\pm$ 1,7	74,0	88,4	46,3 $\pm$ 1,5	42,4	57,4	63,2 $\pm$ 3,5	50,5	87,2
Área 2: próx.Polo Cubatão	MOG	84,3 $\pm$ 2,1	74	95,4	49,0 $\pm$ 1,2	44,1	54,9	79,9 $\pm$ 7,2	51,9	119,5
	QUI	81,7 $\pm$ 2,4	64,8	90,6	47,3 $\pm$ 1,3	38,1	51,6	68,7 $\pm$ 6,2	29,7	95,7
	COS	83,8 $\pm$ 1,9	71,2	91,9	48,5 $\pm$ 1,1	41,2	53,3	76,6 $\pm$ 5,5	46,7	101,4
Área 3: Canal de Santos	SCN	76,7 $\pm$ 5,6	62	102	43,1 $\pm$ 3,0	38,6	56,7	56,3 $\pm$ 14,0	24,3	121,6
	TGA	85,2 $\pm$ 4,6	64,2	97,2	50,9 $\pm$ 2,6	38,3	55,1	81,2 $\pm$ 12,4	26,9	114,0
	PCI	90,4 $\pm$ 1,9	83,1	104,6	53,3 $\pm$ 1,3	46,5	62,3	96,3 $\pm$ 5,1	73,1	129,4
Total		80 $\pm$ 1	55,2	104,6	46,5 $\pm$ 0,6	30,4	62,3	65,7 $\pm$ 2,6	19,9	129,4

EP = Erro padrão; LC= Largura da carapaça; CC= Comprimento da Carapaça

Os dados biométricos das amostras de siris coletadas em dezembro/2011 por ponto de coleta são apresentados na TAB. 11. No APÊNDICE B, são encontrados os dados biométricos por indivíduo deste período, incluindo

sexo e estágio de maturação. Entre os 86 indivíduos analisados, 83 foram classificados como machos (abdome em forma de T), sendo 9 imaturos (abdome selado aos esternitos torácicos) e 74 maduros (abdome flexível). Foram encontradas três fêmeas, todas maduras (abdome oval flexível). O peso total variou de 14,0 g a 126,9 g, com média de $72,2 \pm 2,9$ g. Já o comprimento e a largura da carapaça apresentaram-se, respectivamente, nos intervalos de a 29,0mm a 60,1 mm e 49,6 a 102,3 mm, com médias de $48,0 \pm 0,7$ mm e 82 ± 1 mm.

TABELA 11: Dados biométricos por ponto de coleta e totais dos siris coletados em dezembro/2011(n=86).

Área	Ponto	LC (mm)			CC (MM)			Peso (g)		
		Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.	Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.	Média $\pm$ EP	Mín.	Máx.
Área 1: Canal de S.Vicente	BRC	77,3 $\pm$ 2,7	64,6	89,6	45,5 $\pm$ 1,6	37,8	53,2	56,7 $\pm$ 6,1	32,0	88,0
	PIA	76,4 $\pm$ 1,4	71,6	85,3	44,5 $\pm$ 0,8	41,8	49,5	55,4 $\pm$ 4,1	41,2	82,6
	MAR	65,6 $\pm$ 4,3	49,6	91,6	38,2 $\pm$ 2,4	29,0	52,5	36,7 $\pm$ 7,1	14,0	85,6
Área 2: próx.Polo Cubatão	MOG	88,6 $\pm$ 1,6	80,6	97,0	51,1 $\pm$ 0,8	47,2	55,3	83,0 $\pm$ 4,1	59,0	102,5
	QUI	84,8 $\pm$ 2,2	70,2	97,2	49,5 $\pm$ 1,0	45,4	55,1	76,4 $\pm$ 5,5	53,1	114,0
	COS	88,5 $\pm$ 2,0	79,5	99,0	51,2 $\pm$ 1,1	46,0	56,8	85,3 $\pm$ 6,1	63,7	119,4
Área 3: Canal de Santos	SCN	88,8 $\pm$ 2,8	76,9	101,1	52,3 $\pm$ 1,6	44,4	59,2	93,6 $\pm$ 7,6	55,6	126,9
	TGA	78,5 $\pm$ 3,7	65,8	89,1	46,1 $\pm$ 2,0	38,9	51,3	60,9 $\pm$ 8,9	33,6	86,5
	PCI	91,5 $\pm$ 2,1	84,1	102,3	53,2 $\pm$ 1,0	49,6	60,1	97,2 $\pm$ 5,0	73,5	119,8
Total		82 $\pm$ 1	49,6	102,3	48,0 $\pm$ 0,7	29,0	60,1	72,2 $\pm$ 2,9	14,0	126,9

EP = Erro padrão; LC= Largura da carapaça; CC= Comprimento da Carapaça

Foi observada uma predominância de machos durante os dois períodos de estudo em função do conhecido comportamento migratório das fêmeas para as áreas marinhas (Barreto et al., 2006). Assim sendo, pôde-se inferir que os siris coletados em ambos os períodos compunham uma população homogênea quanto ao sexo, favorecendo a análise de assinaturas químicas. Machos maduros predominaram no período de dezembro/2011, evidenciando a maturação dos jovens identificados em agosto/2011.

7.3.2. Avaliação das concentrações de metais das amostras de tecidos de siris e de sedimento coletados no estuário de Santos, por período de coleta (agosto e dezembro/2011).

Para realizar o controle de qualidade dos procedimentos analíticos, os materiais de referência certificados foram analisados em triplicata. A recuperação para a maioria dos metais foi acima de 70% (TAB. 12). Em comparação com os resultados obtidos no item 7.2 (TAB. 7), houve um aumento considerável da recuperação de Cr em TORT-2 e Oyster tissue. No que diz respeito a Hg, a validação também foi conduzida baseada nos resultados de TORT-2. Com relação ao Al e Cr para Buffalo River sediment, ocorreram baixas recuperações devido ao caráter refratário de ambos os metais. Os limites de detecção de cada metal são apresentados na TAB. 13.

TABELA 12: Concentrações de metais obtidas nas análises dos materiais de referência TORT-2, Oyster tissue e Buffalo River sediment; valores certificados e recuperação (em %).

Lobster hepatopancreas (TORT- 2)											
Metal	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
Média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	x	17,6	0,43	91	0,58	117	0,22	10,2	1,8	0,26	179
EP ^a	x	0,5	0,01	0,2	0,01	0,1	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
Conc.Certif. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	x	26,7	0,51	106	0,77	105	0,27	13,6	2,5	0,35	180
Rec (%)	x	66	84	86	76	112	81	75	71	74	99
Oyster tissue (NIST SRM 1566a)											
Metal	Al	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
Média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	151,3	4,11	0,42	53,5	1,3	541	<LD	8,7	1,81	0,262	852
EP ^a	1,99	0,01	0,01	0,20	0,15	1,9	<LD	0,1	0,004	0,022	5,38
Conc.Certif. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	202,5	4,15	0,57	66,3	1,43	539	0,064	12,3	2,25	0,371	830
Rec (%)	75	99	73	81	91	100	-	75	80	71	103
Buffalo River sediment (NIST SRM 2704 e NIST SRM 8704)											
Metal	Al(%)	Cd	Co	Cu	Cr	Fe(%)	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
Média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2,53	2,73	11,2	93,7	83,9	3,36	1,65	555,3	45,5	153,4	441,9
EP ^a	0,55	0,47	0,1	0,6	2,5	0,07	0,06	5,8	0,7	2,5	1,1
Conc.Certif. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6,11 _a	2,94 _b	14,0 _a	98,6 _a	135,0 _a	4,11 _a	1,47 _a	555,0 _a	44,1 _a	161,0 _a	438,0 _a
Rec (%)	41	93	80	95	62	82	112	100	103	95	100

^a NIST SRM 2704; ^b NIST SRM 8704; EP= erro padrão; * Não há concentração certificada para este metal

– Não houve recuperação; LD= limite de detecção

TABELA 13: Limites de detecção (LD) para as amostras de siri (a) e de sedimento (b).

Siri (a)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	0,059 ^a
Cd	0,00002 ^a
Co	0,00004 ^a
Cr	0,003 ^a
Cu	0,006 ^b
Fe	0,285 ^b
Hg	0,001 ^c
Mn	0,0004 ^a
Ni	0,003 ^a
Pb	0,0004 ^a
Zn	0,016 ^b
Sedimento (b)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al (%)	0,0001 ^b
Cd	0,001 ^d
Co	0,014 ^b
Cr	0,029 ^b
Cu	0,025 ^b
Fe (%)	0,00003 ^b
Hg	0,0004 ^c
Mn	0,002 ^b
Ni	0,027 ^b
Pb	0,016 ^b
Zn	0,04 ^b

a= HR-ICPMS; b= AAS; c=FIA; d=GF AAS

Os dados de mediana de concentração de metais, valores mínimos e máximos por tipo de tecido em ambos os períodos estudados são apresentados nas TAB. 14 e 15, como forma de descrição geral dos dados.

Nas amostras de tecidos de siris coletadas em agosto/2011, foi possível detectar por meio do teste de Kruskal-Wallis que as concentrações de Cd, Co, Cr, Ni e Zn foram maiores no hepatopâncreas; as concentrações de Al, Cu, Fe, Mn e Pb foram maiores nas brânquias e Hg, nos músculos (TAB. 14).

TABELA 14: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de *C. danae* coletados em agosto/2011 (n=246). Valores com letras iguais (a,b,c...) numa mesma coluna (metal) indicam significância (Kruskal-Wallis: $p < 0,05$).

Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	28,9 ^{a,b}	0,021 ^a	0,067 ^a	0,103 ^b	41,9 ^a	113 ^a	0,02 ^a	9,8 ^a	0,22 ^a	0,139 ^a	15,8 ^a
Mínimo	<LD	0,009	0,011	<LD	17,3	21	<LD	1,4	0,05	0,011	7,6
Máximo	1131,7	0,083	70,496	3,888	80,2	840	0,06	84,9	14,74	4,741	29,9
Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	5,2 ^a	0,041 ^a	0,187 ^a	0,110 ^a	25,5 ^a	47 ^a	0,05 ^a	5,3 ^a	0,46 ^a	0,058 ^a	35,6 ^a
Mínimo	<LD	0,004	0,014	<LD	3,1	11	<LD	1,9	0,10	0,005	13,8
Máximo	280	0,365	0,484	6,654	157,1	193	0,14	58,6	2,78	1,014	87,8
Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	3,9 ^b	0,004 ^a	0,019 ^a	0,091 ^a	9,4 ^a	12 ^a	0,08 ^a	1,0 ^a	0,14 ^a	0,019 ^a	27,7 ^a
Mínimo	<LD	0,003	0,009	<LD	3,1	<LD	<LD	0,5	<LD	<LD	16,4
Máximo	40,1	0,024	0,062	4,416	18,3	771	0,34	31,5	0,28	0,131	46,9

LD= limite de detecção

Para o período de dezembro/2011, a maioria das amostras de tecidos de siris se encontrou abaixo do limite de detecção para os elementos Cd, Co, Ni e Pb. As concentrações de Cr e Zn foram maiores no hepatopâncreas; as concentrações de Al, Cu, Fe e Mn foram maiores nas brânquias e Hg foi mais elevado nos músculos, similar ao que ocorreu para o período de agosto/2011(TAB.15).

TABELA 15: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de *C. danae* coletados em dezembro/2011(n=258). Valores com letras iguais (a,b,c...) numa mesma coluna (metal) indicam significância (Kruskal-Wallis: $p < 0,05$).

Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	122,0 ^a	<LD	0,400	0,490 ^a	36,8 ^a	268 ^a	0,02 ^a	15,0 ^a	<LD	0,400	13,9 ^a
Mínimo	14,5	<LD	<LD	<LD	13,2	21	<LD	2,7	<LD	<LD	5,9
Máximo	816,5	<LD	0,437	1,309	71,7	820	0,12	193,0	<LD	5,824	39,0
Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	25,5 ^a	0,400	0,400	0,791 ^a	29,7 ^b	50 ^a	0,05 ^a	7,7 ^a	0,40	<LD	32,5 ^a
Mínimo	9,2	<LD	<LD	<LD	7,7	20	<LD	1,9	<LD	<LD	10,4
Máximo	107,5	0,761	0,814	4,847	186,8	242	0,28	51,6	2,37	<LD	261,3
Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	12,5 ^a	<LD	<LD	0,458 ^b	9,5 ^a	9 ^a	0,08 ^a	2,1 ^a	<LD	<LD	23,9 ^a
Mínimo	7,6	<LD	<LD	<LD	4,2	<LD	<LD	1,3	<LD	<LD	16,2
Máximo	73,2	<LD	<LD	0,947	15,3	29	0,48	12,9	<LD	<LD	35,9

LD=limite de detecção

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com a bibliografia existente sobre o uso de indivíduos do gênero *Callinectes* como biomonitores na mesma região de estudo, foi observado que os valores das medianas das concentrações obtidas para Cd, Cr, Cu, Pb e Zn também estiveram abaixo daquelas encontradas por Virga (2006), Virga et al. (2007) e Virga e Geraldo (2008) em indivíduos do gênero *Callinectes* provenientes do Rio Cubatão.

Comparando os resultados do presente estudo com estudos em outras regiões utilizando indivíduos da espécie *C. danae*, observou-se variabilidade nas concentrações de metais obtidas nos tecidos. No presente trabalho, os valores das concentrações medianas obtidos para Hg nos músculos foram maiores que aquela obtida por Wakasa (2003) ($0,024 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$) em *C. danae* coletados na baía de Guanabara (RJ). Em comparação à concentração de Cu encontrada no

presente estudo, Catelani (2009) obteve menor concentração em músculos de *C. danae* ($3,2 \pm 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$) coletados na lagoa de Mundaú (AL). Os valores das medianas de Zn obtidos neste estudo também estiveram de acordo a concentração média obtida em músculo pelo mesmo autor ($26,3 \pm 3,3 \mu\text{g g}^{-1}$).

Os resultados mostraram que as concentrações de Fe foram mais altas nas brânquias. Sabe-se que este elemento desempenha papel vital nos processos enzimático e respiratório de crustáceos (Ong Che e Cheung, 1998), e isto pode explicar os resultados obtidos. Na hemolinfa, Cu faz parte da composição da molécula de hemocianina. Engel (1987) também encontrou este elemento em concentrações elevadas durante a intermuda devido ao aumento de metalotioneínas (proteínas de baixo peso molecular que podem se ligar a elementos metálicos tanto para mediar processos metabólicos essenciais como de detoxificação) como doadoras de Cu na síntese de hemocianina. Já que a hemocianina está ativamente envolvida com o processo de respiração, esta deve ser a razão para as elevadas concentrações de Cu encontradas nas brânquias. Segundo este autor, o elemento Zn pode se ligar a hemocianina rica em Cu e participar de reações com enzimas Zn- dependentes como as anidrases carbônicas, ATPases (Haya et al., 1983) e GST (Elumalai et al., 2007) que ocorrem nas brânquias e no hepatopâncreas. Com base nestas informações, os resultados trazem indícios que estes metais são essenciais e suas concentrações devem estar de acordo com a demanda do organismo.

A maioria dos metais (com exceção do Hg) apresentou concentrações medianas mais elevadas nas brânquias e no hepatopâncreas. Quanto ao Hg, estudos anteriores com *Callinectes sapidus* (Sastre et al., 1999; Reichmuth et al., 2009; Reichmuth et al., 2010) e *Carcinus maenas* (Coelho et al., 2008) também reportaram que a concentração deste elemento foi mais elevada no tecido muscular. Segundo Pereira et al. (2006), a dieta é a principal via de absorção de Hg para *Carcinus maenas*, já que o Hg inorgânico (presente principalmente nas frações dissolvida e particulada) é eliminado mais facilmente que as frações orgânicas que são incorporadas pela dieta. De acordo com Reichmuth et al. (2010), Hg em sistemas aquáticos tende a estar metilado, fortemente ligado a membranas e lipídios, pouco suscetível a depuração. Assim, devido à elevada

concentração de lipídios nos músculos, o Hg metilado tende a fixar-se neste tecido em detrimento aos demais, independente da via em que é absorvido.

Com relação ao sedimento, os dados de concentração de metais nas amostras coletadas em ambos os períodos de estudo são apresentados na TAB.16 como forma de descrição geral dos dados.

TABELA 16: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nas amostras de sedimento coletadas em agosto/2011 (n=27) e dezembro/2011 (n=27) e valores TEL e PEL segundo à Legislação Canadense (CCME, 2001).

Sedimento ago/2011	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	1,47	0,10	5	17,8	11,1	1,13	0,40	180,6	8,72	10,1	53,3
Mínimo	0,3	<LD	<LD	3,5	<LD	0,18	0,06	17,5	<LD	<LD	6,0
Máximo	7,34	3,27	15	76,3	142,5	13,83	1,96	2858,3	63,93	253,1	1322,1
Sedimento dez/2011	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	1,57	0,10	6	20,7	5,2	1,09	0,12	163,4	8,73	5,8	35,6
Mínimo	0,20	<LD	<LD	3,3	<LD	0,11	0,05	13,2	<LD	<LD	5,1
Máximo	7,97	3,41	12	89,9	34,7	5,97	2,67	612,8	37,16	76,3	233,2
CCME (2001)	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
TEL $\mu\text{g g}^{-1}$	-	0,70	-	52,3	18,7	-	0,13	-	15,90	30,2	124,0
PEL $\mu\text{g g}^{-1}$	-	4,21	-	160,0	108,0	-	0,70	-	42,80	112,0	271

LD=limite de detecção

Em linhas gerais, todos os metais apresentaram concentrações medianas na mesma ordem de grandeza em ambos os períodos. Comparando os resultados com os valores limítrofes da Legislação Canadense (CCME, 2001), estiveram abaixo de TEL todas as medianas obtidas (com exceção da mediana de Hg em agosto/2011), os valores máximos de Cd e Cr em ambos os períodos e os valores máximos de Cu, Ni, Pb e Zn em dezembro/2011. Já os valores máximos de Hg nos dois períodos e os de Cu, Ni, Pb e Zn em agosto/2011 foram mais elevados que PEL, sugerindo risco muito provável a biota. As medianas de Al estiveram de acordo com observações de Bordon et al. (2011), entretanto os valores máximos obtidos para ambos os períodos foram demasiadamente elevados.

Com exceção do Cu, as concentrações de metais obtidas para as amostras de sedimento foram consideravelmente mais elevadas que as observadas nas amostras de siris. Como já citado na avaliação preliminar do sedimento e segundo Quináglia (2006), diferentes variáveis podem competir dinamicamente para adsorver metais (como matéria orgânica, porcentagem de silte-argila, entre outros), reduzindo a biodisponibilidade. Segundo Siqueira et al.(2005), a presença de teores elevados de metais nos sedimentos não constituem necessariamente uma biodisponibilidade destes para biota associada, entretanto a variação de parâmetros físico-químicos (pH, Eh, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e outros) das águas circundantes pode promovê-la. Além disso, Rainbow (2002) afirmou que a proporção relativa de absorção de metais varia com a espécie de invertebrado e com a biodisponibilidade relativa do metal na água e na dieta. Os resultados mostraram que os valores das medianas obtidas para a presente análise do sedimento estiveram abaixo do valor de referência que indica riscos à biota. Portanto, nem todos os metais devem estar disponíveis aos siris na mesma proporção que encontramos no sedimento, o que provavelmente interfere na absorção de metais pelos organismos. Isso pôde ser confirmado nos resultados de concentrações de metais em tecidos de siris, uma vez que alguns dos valores máximos obtidos sugerem que alguns indivíduos estiveram expostos à quantidades mais elevadas que outros (provavelmente em função da diferente biodisponibilidade de metais), refletindo a complexidade do próprio sistema estuarino.

Prosseguindo com os testes estatísticos, foi realizada a análise discriminante canônica. Para esta análise, também foram considerados todos os dados de concentração de metais por indivíduo, independente de seu estágio de desenvolvimento e maturação, abrangendo as possíveis variações intra-específicas que podem ocorrer na absorção de metais.

Antes de sua realização, os dados obtidos de concentração de metais foram normalizados na base logarítma $\log_{10}(x+1)$. Dessa forma, não foram retirados valores que poderiam ser considerados como extremos ou fora da amplitude de distribuição. Visto que o estudo teve como objetivo a análise de padrões de distribuição de dados de concentração de metais para a identificação

de assinaturas químicas, foram respeitadas as informações fornecidas pelo meio ambiente.

Primeiramente e de modo a verificar se a acumulação de metais nos indivíduos discriminou o tipo de tecido nos períodos de estudo (agosto e dezembro/2011, separadamente), foi realizada a referida análise discriminante apenas com os dados de concentração de metais obtidos das amostras de tecidos de siris.

Para os dados de agosto/2011, o poder discriminante do modelo foi consideravelmente significativo ($p < 0,000$). As funções discriminantes I e II foram responsáveis por 100% da separação total entre os grupos. O gráfico de função discriminante I *versus* função discriminante II mostrou claramente a separação dos músculos e das brânquias pela função I e de músculos e hepatopâncreas pela função II (FIG.12).

Os elementos Cu (em maior concentração nas brânquias) e Zn (em maior concentração nos músculos que nas brânquias) apresentaram os maiores coeficientes e tiveram maior contribuição no poder discriminatório da função I. Por outro lado, a separação de músculos e hepatopâncreas pela função II ocorreu principalmente pela contribuição do coeficiente de Ni (em maior concentração no hepatopâncreas) (TAB. 17).

FIGURA 12: Função discriminante I *versus* função discriminante II dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) coletadas em agosto/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 17: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris coletadas em agosto/2011 (n=246).

Wilks' λ : 0,06		p<0,000
Funções discriminantes	I	II
Autovalor	5,41	1,41
Variância Acumulada	0,79	1,00
Valor X ²	654,7*	210,5*
Graus de Liberdade	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante	
Zn	-0,75	-0,42
Fe	0,45	-0,17
Cu	0,54	-0,20
Hg	-0,30	0,33
Cd	-0,09	-0,32
Ni	-0,01	-0,55
Al	0,19	0,42
Mn	0,04	-0,27
Pb	0,04	0,19
Grupo	Médias das Variáveis Canônicas	
Brânquias	3,16	0,41
Hepatopâncreas	-0,88	-1,60
Músculos	-2,28	1,19

*Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

Para os dados de dezembro/2011, o poder de discriminação do modelo foi também significativo ($p < 0,000$). As funções discriminantes I e II foram responsáveis por 100% da separação total entre os grupos. Assim como no período anterior, o gráfico da função discriminantes I *versus* função discriminante II demonstrou a separação dos músculos e das brânquias pela função I e de músculos e hepatopâncreas pela função II (FIG.13).

Os elementos Fe (em maior concentração nas brânquias) e Zn (em maior concentração nos músculos que nas brânquias) apresentaram os maiores coeficientes e tiveram maior contribuição no poder discriminatório da função I. Por outro lado, a separação de músculos e hepatopâncreas pela função II ocorreu principalmente pela contribuição do coeficiente de Cr (em maior concentração no hepatopâncreas) (TAB. 18).

FIGURA 13: Função discriminante I *versus* função discriminante II dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) coletadas em dezembro/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 18: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris coletadas em dezembro/2011 (n=258).

Wilks' λ : 0,04		p<0,0000
Funções discriminantes	I	II
Autovalor	10,38	1,20
Variância Acumulada	0,90	1,00
Valor X ²	807,2*	198,0*
Graus de Liberdade	20	9
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante	
Fe	0,86	-0,14
Zn	-0,79	-0,48
Cu	0,44	-0,39
Cr	-0,01	-0,64
Hg	-0,24	0,27
Pb	-0,13	0,34
Mn	0,28	-0,15
Al	0,10	0,35
Co	-0,20	0,01
Ni	0,17	0,07
Grupo	Médias das Variáveis Canônicas	
Brânquias	4,14	0,63
Hepatopâncreas	-0,46	-1,53
Músculos	-3,67	0,91

*Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

Na bibliografia existente, os elementos Cu, Zn e Fe já tinham sido reportados como elementos essenciais em diversos mecanismos (Brouwer e Engel, 1982; Brouwer et al., 1984; Engel e Brouwer, 1984; Depledge, 1989; Landry e Topham, 1990). Os resultados mostraram que os coeficientes desses metais foram responsáveis pela separação dos dados de brânquias e músculos nos períodos de estudo. Analisando os gráficos apresentados nas FIG. 12 e 13, não se observou qualquer sobreposição de dados de brânquias e músculos em nenhum dos períodos estudados. Uma hipótese para este resultado é que esses mecanismos que envolvem Cu, Fe e Zn nas brânquias não sejam diretamente ligados aos que ocorrem nos músculos. No presente caso, metais que são absorvidos nas brânquias não devem ser proporcionalmente transferidos aos músculos, sugerindo que cada um destes tecidos reflete momentos ou vias distintas de absorção de metais.

Os coeficientes que separaram os dados de hepatopâncreas não foram os mesmos para agosto e dezembro/2011. Entretanto, observando as TAB. 14 e 15, Ni e Cr apresentaram concentrações mais elevadas no hepatopâncreas em ambos os períodos.

Com base nos resultados obtidos, foi elaborada uma hipótese para o processo de absorção de metais nos tecidos dos siris. Nessa hipótese, os contaminantes chegam às brânquias através da respiração e alguns já são eliminados por mecanismos de detoxificação previamente reportados por Ahearn et al. (2004) e Pereira et al. (2006). Parte do que é absorvido pelas brânquias é encaminhado ao hepatopâncreas (demonstrado pela baixa sobreposição de dados entre os dois tecidos na análise discriminante), provavelmente via hemolinfa. O hepatopâncreas também recebe contaminantes adquiridos pela via alimentar. Este tecido é conhecido como um órgão de depósito, onde metalotioneínas são encontradas em elevadas concentrações e se ligam a certos metais (Nash et al., 1981; Engel e Brouwer, 1984; Sastre et al., 1999; Harris e Santos, 2000). Segundo Hopkin e Nott (1979) e Ahearn et al. (2004), metais podem ser excretados como grânulos neste processo com o objetivo de manter a homeostase. Estes fatos podem ter motivado as elevadas concentrações de metais neste tecido quando comparado ao tecido muscular. Após metabolização,

o conteúdo do hepatopâncreas é distribuído para outros tecidos, como músculos, o que explica a pequena sobreposição das elipses desses tecidos. De acordo com os resultados, o que chega as brânquias não deve ser proporcionalmente encaminhado aos músculos (já que não há qualquer sobreposição de dados).

Embora a maioria dos elementos de interesse tenha sido detectada em todos os tecidos, os resultados obtidos mostraram que houve a distinção dos tipos de tecidos de *C. danae* conforme a acumulação diferenciada de metais que ocorre nas brânquias, hepatopâncreas e músculos. Isso está de acordo com o que foi reportado na análise preliminar de teor de metais nos tecidos de siris e posteriormente publicado por Bordon et al.(2012).

A partir dessas observações, foram adicionados os dados de concentração de metais obtidos nas amostras de sedimento à análise discriminante. Sendo o sedimento uma fonte potencial de metais no ambiente bentônico, o objetivo desta análise foi verificar se existia relação dos dados de algum dos tecidos avaliados com o conteúdo adsorvido no sedimento. Foi também avaliada a existência de uma assinatura química para o estuário de Santos.

Para o período de agosto/2011, observou-se a separação das amostras de sedimento das de tecidos de siris (FIG.14a). Os coeficientes padronizados de Pb e Zn foram os mais elevados e responderam por esta separação na função I. Já na FIG.14b, observou-se a separação de brânquias e músculos na função II (com principal contribuição do coeficiente de Zn) enquanto que os dados de hepatopâncreas foram identificados na função III pelos coeficientes de Pb e Ni (TAB.19).

FIGURA 14: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 19: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris (n=246) e de sedimento (n=54) coletadas em agosto/2011.

Wilks' λ : 0,001	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	16,86	4,46	1,05
Variância acumulada	0,75	0,95	1,00
X ²	1401,4*	639,1*	190,1*
Graus de liberdade	33	20	9
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Cr	0,37	0,14	-0,23
Fe	-0,46	0,46	0,14
Zn	-1,05	-1,41	0,61
Pb	0,84	0,66	-1,46
Cu	-0,16	0,67	0,16
Mn	0,6	0,22	0,42
Al	-0,49	0,05	-0,4
Ni	0,26	-0,03	1,13
Co	0,39	-0,04	0,18
Hg	0,01	-0,21	-0,69
Cd	-0,22	0,02	0,66
	Médias das variáveis canônicas		
Brânquias	-1,01	3,00	-0,47
Hepatopâncreas	-1,71	-0,63	1,46
Músculos	-1,31	-2,28	-1,03
Sedimento	12,27	-0,25	0,16

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

Para o período de dezembro/2011, observou-se a separação das amostras de sedimento das amostras de tecidos de siris (FIG. 15a). O coeficiente padronizado de Co foi o mais elevado e respondeu por esta separação na função I. Já na FIG. 15b, observou-se a separação de brânquias e músculos na função II (com principal contribuição dos coeficientes de Fe e Zn) enquanto que os dados de hepatopâncreas foram identificados na função III pelo Cr (TAB.20).

FIGURA 15: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em dezembro/2011. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 20: Parâmetros da análise discriminante canônica realizada com os dados das amostras de tecidos de siris (n=258) e de sedimento (n=54) coletadas em dezembro/2011

Wilks' λ : 0,001		p<0,0000	
Funções			
Discriminantes	I	II	III
Autovalor	37,61	9,17	1,05
Variância acumulada	0,79	0,98	1,00
X ²	1850,9*	840,7*	199,5*
Graus de liberdade	33	20	9
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Co	-0,96	0,33	0,55
Fe	0,11	0,86	-0,15
Zn	0,54	-1,16	-0,53
Hg	0,44	-0,57	0,51
Cu	0,20	0,41	-0,48
Cr	-0,44	-0,02	-1,04
Al	0,44	0,01	0,45
Pb	-0,32	0,01	0,54
Mn	-0,01	0,31	-0,20
Cd	0,25	0,21	-0,16
Ni	-0,10	0,39	0,01
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	2,69	3,96	0,62
Hepatopâncreas	2,15	-0,58	-1,50
Músculos	1,02	-3,68	0,90
Sedimento	-18,71	0,96	-0,11

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

A separação das amostras de tecido e sedimento nas FIG. 14a e 15a reflete a diferença em ordem de magnitude nos valores de concentração, já que as concentrações de Pb e Zn em agosto/2011 e de Co em dezembro/2011 foram muito mais elevadas nas amostras de sedimento do que nas amostras dos tecidos dos siris (TAB. 14, 15 e 16).

Foi verificado que o coeficiente de Zn em agosto/2011 e os de Zn e Fe em dezembro/2011 mediaram a separação de dados de brânquias e músculos na análise discriminante. Este resultado era esperado, conforme descrito nos testes anteriormente apresentados.

Mesmo que as concentrações de metais nas amostras de sedimento tenham sido mais elevadas que aquelas obtidas nas amostras de tecidos, foi observada uma correspondência gráfica dos dados referentes à hepatopâncreas e sedimento. Embora não possa ser considerada uma sobreposição total de

dados, estes resultados sugeriram que houve alguma relação entre os dados de hepatopâncreas e o conteúdo total de metais adsorvidos ao sedimento. Branco e Verani (1997) registraram a areia como um dos ítems de maior frequência no conteúdo estomacal de *C. danae* e sugeriram que esta ingestão ocorre junto com presas como outros crustáceos e poliquetos. Mantelatto e Christofolletti (2001) reportaram que 48,7% da dieta natural de *Callinectes ornatus* corresponde (entre outros resíduos) a sedimento. Reichmuth et al.(2009) reportaram que 60% do conteúdo estomacal de *Callinectes sapidus* corresponde, entre outros resíduos, a sedimento ingerido. Com base nessas informações, foi possível confirmar que estes organismos se alimentam do sedimento circundante. Entretanto, nem tudo o que está no sedimento é absorvido, pois podem ocorrer perdas durante o processo digestivo e outros processos metabólicos e que podem explicar, total ou parcialmente, a correspondência gráfica dos dados de hepatopâncreas e sedimento na análise discriminante canônica (FIG.14 e 15).

Fazendo uma avaliação comparativa do hepatopâncreas com os demais tecidos estudados, este órgão é conhecido pela sua função detoxificadora e sua capacidade de imobilizar em grânulos metais potencialmente tóxicos e absorvidos pelo organismo. Devido a este fato, este tecido foi escolhido como prioritário para análise de metais em estudos anteriores com crustáceos (Hopkin e Nott, 1979; Jennings e Rainbow, 1979; Davies et al., 1981; Rainbow, 1988; Darmono e Denton, 1990; McPherson e Brown, 2001). Segundo Chapman (1985) e Mcpherson e Brown (2001), resultados da análise de metais no hepatopâncreas também têm a vantagem de não serem confundidos com os do conteúdo intestinal, ou seja, que já está pronto para ser eliminado.

Sabe-se que as brânquias são principal órgão do sistema respiratório dos siris e devem refletir a exposição imediata por metais dissolvidos na coluna d'água. Lamparelli et al. (2001) registrou baixas concentrações de metais na coluna d'água no estuário de Santos. Martins (2006) observou que alterações na salinidade modificam a concentração de metalotioneínas das brânquias de *Callinectes sapidus* e este fato não favoreceria a biomonitoração utilizando este tecido. Assim sendo, quando ocorrem uma alteração comum a sistemas estuarinos como a entrada de água doce de outros rios (com consequente

alterações de parâmetros como temperatura, salinidade, pH, entre outros), a concentração nas brânquias deve ser rapidamente alterada em função da mudança na disponibilidade de metais.

Com relação aos músculos, o Hg foi o único elemento que apresentou concentrações elevadas neste tecido. Porém, essa absorção de Hg independe da via de entrada, embora os resultados da análise discriminante sugiram que não há um transporte direto dos metais que são absorvidos nas brânquias para os músculos. Provavelmente, a maioria dos metais que chegam aos músculos devem ser provenientes de outras vias que não a respiratória. Como foram observadas baixas concentrações dos demais metais neste tecido, o transporte até os músculos deve sofrer algumas perdas que podem estar relacionadas aos processos metabólicos naturais (não avaliados neste estudo), o que deve tornar mais lenta a acumulação de metais neste tecido.

Como base nessas informações, os resultados permitiram a identificação de um padrão de distribuição de dados que se repetiu nos períodos de agosto e dezembro/2011, sugerindo a existência de uma assinatura química para o estuário de Santos que pôde ser relacionada ao compartimento que o siris habita (sedimento). Não se encontrou na literatura nenhum trabalho que apresentasse a mesma abordagem. A maioria dos estudos prioriza a avaliação dos níveis de metais que são absorvidos pelos organismos, seja em condições naturais ou simuladas em laboratório (Jop et al., 1997; Sastre et al., 1999; Reichmuth et al., 2009; Reichmuth et al., 2010). Recentemente, Bastami et al. (2012) (avaliando Cd, Co, Cu, Ni e Pb), Hosseini et al. (2012) (avaliando Fe, Hg, Ni e P) e Khoei e Bastami (2013) (avaliando Hg) observaram que as concentrações de metais no sedimento também eram maiores que as obtidas nas carapaças, nos músculos e nos hepatopâncreas de siris da espécie *Portunus pelagicus* do golfo pérsico. Entretanto, em nenhum dos trabalhos citados foi encontrada uma investigação da relação destes tecidos com o sedimento e o local de estudo.

Os resultados aqui apresentados não invalidam o uso dado anteriormente aos tecidos em monitoramento ambiental. Todavia, essas novas informações agregam mais conhecimento sobre o uso em conjunto desses

tecidos para avaliação de um organismo biomonitor. O risco de falsos positivos quando se utiliza apenas um tecido na avaliação ambiental é reduzido pela abordagem apresentada. Os dados obtidos de concentração de metais nos tecidos mostraram uma variação que pode chegar até duas ordens de magnitude. Dessa forma, a avaliação somente desses dados de concentração ou de apenas um tecido poderiam levar a uma interpretação errônea do que realmente está acontecendo no ecossistema estuarino. Essa variação está relacionada a complexidade do estuário de Santos, em função dos diversos processos que alteram rapidamente a disponibilidade de metais.

Em linhas gerais, o uso dos três tecidos estudados torna mais robusta a identificação de reais alterações nos níveis de exposição dos indivíduos. Permite considerar que a complexidade do sistema pode levar a variações bruscas dos níveis de metais sem, entretanto, estar relacionada a uma inserção antropogênica resultante do meio.

7.3.3. Validação do modelo para assinaturas químicas e simulações para confirmação do caráter definitivo de *C. danae* como biomonitor.

Neste trabalho, propõe-se a validação do modelo obtido por meio de um conjunto de procedimentos que visam testar: 1) a robustez em função do tempo; 2) a especificidade para a região de estudo; 3) a sensibilidade de cada tecido às alterações dos níveis de metais.

Para a realização de todos esses procedimentos, novas amostras de siris foram coletadas no estuário de Santos (SP) e em Ilha Grande (RJ) em março/2013. Primeiramente, são apresentados os dados biométricos desses novos indivíduos (TAB. 21).

Todos os indivíduos coletados no estuário de Santos eram machos, sendo considerados maduros (abdome triangular flexível). O peso total variou de 53,1 g a 129,5g, com média de 83 ± 8 g. Já o comprimento e a largura da carapaça apresentaram-se, respectivamente, nos intervalos de 44,7 a 54,0 mm e 77,0 a 95,4 mm, com médias de 50 ± 1 mm e 87 ± 2 mm.

Os indivíduos coletados em Ilha Grande também eram machos, sendo considerados maduros (abdome triangular flexível). O peso total variou de 63,3 g a 91,7 g, com média de 80 ± 4 g. Já o comprimento e a largura da carapaça apresentaram-se, respectivamente, nos intervalos de 45,0 a 50,0 mm e 105,0 a 120,0 mm, com médias de $49,3 \pm 0,7$ mm e 113 ± 2 mm.

TABELA 21: Sexo, estágio de maturação (EM), peso total (PT), comprimento (CC) e largura (LC) da carapaça dos indivíduos analisados da espécie *C. danae* coletados no estuário de Santos (n= 9) e em Ilha Grande (n=7) no período de março/2013.

Estuário de Santos					
Nº	Sexo	EM	PT	CC(mm)	LC(mm)
1	M	M	83,9	49,5	89,2
2	M	M	92,0	52,9	92,4
3	M	M	75,2	51,7	88,0
4	M	M	129,5	54,0	95,4
5	M	M	66,1	46,1	80,0
6	M	M	98,2	51,4	88,3
7	M	M	85,5	52,8	90,0
8	M	M	60,0	46,4	79,9
9	M	M	53,1	44,7	77,0
Média	x	X	83	50	87
EP ^a	x	X	8	1	2
Min.	x	X	53,1	44,7	77,0
Máx.	x	X	129,5	54,0	95,4
Ilha Grande					
Nº	Sexo	EM	PT	CC(mm)	LC(mm)
1	M	M	87,4	50,0	110,0
2	M	M	91,7	50,0	120,0
3	M	M	86,1	50,0	120,0
4	M	M	69,4	45,0	105,0
5	M	M	85,9	50,0	115,0
6	M	M	76,7	50,0	110,0
7	M	M	63,3	50,0	110,0
Média	x	x	80	49,3	113
EP ^a	x	x	4	0,7	2
Min.	x	x	63,3	45,0	105,0
Máx.	x	x	91,7	50,0	120,0

EP = Erro padrão; Sexo: F= fêmea; M=macho; Estágio de maturação (EM): M=maduro; I= imaturo; O=ovígera

A recuperação obtida para a maioria dos metais no material de referência certificado DORM-3 foi acima de 70% (TAB. 22). Os limites de detecção de cada metal são apresentados na TAB. 23.

TABELA 22: Concentrações de metais obtidas nas amostras do material de referência DORM-3, valores certificados e recuperação (em %).

DORM-3										
Metal	Al	Cd	Cu	Cr	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
Média	1981	0,30	2,36	14,5	363	0,38	2,8	1,13	0,282	50,6
($\mu\text{g g}^{-1}$)										
Conc.Certif.	1700	0,29	1,89	15,5	347	0,382	4,6	1,28	0,395	51,3
($\mu\text{g g}^{-1}$)										
Rec (%)	117	104	125	93	105	100	61	88	71	99

TABELA 23: Limites de detecção (LD) para as amostras de siri coletadas em março/2013 (ICPMS).

Metal	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	0,2
Cd	0,001
Co	0,001
Cr	0,024
Cu	0,01
Fe	0,5
Hg	0,001
Mn	0,003
Ni	0,003
Pb	0,025
Zn	0,05

- Robustez em função do tempo

Para o teste de robustez em função do tempo, foram realizadas as análises químicas das amostras coletadas no estuário de Santos. As concentrações de Cd, Co, Cr, Cu e Ni foram maiores no hepatopâncreas; as concentrações de Al, Fe, Mn e Pb foram maiores nas brânquias; Hg e Zn foram mais elevados nos músculos (TAB.24). Estes resultados foram muito similares aos obtidos para os períodos de agosto e dezembro/2011 na mesma região.

TABELA 24: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de *C. danae* coletados no estuário de Santos em março/2013 (n=27).

Brânquias	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	85,4	0,019	0,049	0,972	28,7	152	0,01	5,5	0,16	0,387	11,5
Mínimo	30,7	0,013	0,033	0,796	19,5	50	<LD	2,8	0,15	0,193	8,9
Máximo	105,6	0,043	0,073	1,639	66,9	280	0,03	20,8	1,72	0,949	21,1
Hepato	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	4,7	0,063	0,111	1,146	41,4	75	0,03	4,4	0,31	0,199	20,5
Mínimo	2,4	0,020	0,047	0,500	22,3	31	0,02	1,1	0,15	0,112	16,0
Máximo	11,8	0,183	0,180	1,422	64,8	151	0,05	23,2	0,89	0,218	33,2
Músculos	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	1,1	0,014	0,027	1,055	10,9	18	0,04	2,6	0,14	0,093	27,6
Mínimo	<LD	<LD	0,007	0,796	8,7	5	0,02	0,2	0,04	<LD	15,4
Máximo	6,5	0,036	0,072	1,819	23,9	139	0,06	56,7	1,06	0,136	52,5

LD= limite de detecção

Prosseguindo com a validação do modelo estabelecido, os dados das amostras de siris e sedimentos coletados em agosto e dezembro/2011 foram utilizados como uma base prévia de dados. Em seguida, os dados de concentração de metais de amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013 foram adicionados à base prévia de dados na análise discriminante.

São apresentados gráficos de dispersão dos dados da função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III (FIG. 16 a,b -estuário de Santos). Os resultados destas análises são apresentados na TAB. 25.

De acordo com os dados descritivos (TAB. 25), a função I foi novamente responsável pela separação dos dados de tecido e sedimento. O coeficiente de Zn permaneceu contribuindo fortemente no poder discriminante da função II. Como pode ser observado pelos gráficos de função II *versus* função III (FIG. 16b), verificou-se que os dados dos siris coletados no estuário de Santos em 2013 se sobrepuseram à base prévia de dados. Logo, o modelo foi bastante robusto quando novas amostras do estuário de Santos foram adicionadas, mesmo sendo coletadas dois anos após o estabelecimento da base de dados.

FIGURA 16: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias). As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 25: Parâmetros da análise discriminante realizada com os dados das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados de concentração de metais das amostras de tecidos de siris (n=27) coletados no estuário de Santos em março/2013.

Wilks' λ : 0,003		p<0,0000	
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	18,30	5,34	0,83
Variância acumulada	0,73	0,93	0,98
χ^2	3327,5*	1625,2*	562,5*
Graus de liberdade	66	50	36
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Ni	0,28	0,23	-0,26
Fe	-0,36	0,65	-0,27
Zn	-0,60	-1,30	-0,66
Cu	-0,18	0,58	-0,32
Pb	0,63	0,47	1,10
Cd	-0,44	-0,32	-0,63
Cr	0,57	0,18	-0,57
Al	-0,61	-0,14	0,60
Mn	0,32	0,31	-0,23
Co	0,41	-0,04	0,06
Hg	-0,14	-0,12	0,66
	Médias das variáveis canônicas		
Brânquias	-1.85	3.02	0.50
Hepato	-1.56	-0.61	-1.25
Músculos	-0.78	-2.80	0.86
Sedimento	13.24	0.63	-0.06
Brânquias_SP	-1.09	3.36	1.14
Hepato_SP	-0.43	1.64	-1.68
Músculos SP	0.48	-1.41	-1.20

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

- Especificidade para região de estudo

Para testar a especificidade local do modelo, foram realizadas análises químicas das amostras coletadas em uma outra região que não o estuário de Santos (Ilha Grande, RJ). A concentração de metais na maioria das amostras de músculo esteve abaixo do limite de detecção. As concentrações de Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Zn foram maiores no hepatopâncreas; as concentrações de Al, Fe, Mn e Pb foram maiores nas brânquias (TAB.26).

TABELA 26: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais encontradas nos tecidos (base úmida) de *C. danae* coletados em Ilha Grande em março/2013(n=18).

Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	18,1	0,007	0,015	0,083	8,4	64	0,002	2,2	0,07	0,223	5,0
Mínimo	4,6	0,004	0,006	<LD	2,9	5	<LD	1,6	0,03	<LD	2,4
Máximo	34,4	0,018	0,021	0,178	26,4	110	0,004	8,6	0,08	0,613	6,5
Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	0,6	0,041	0,025	0,092	10,5	6	0,002	1,9	0,18	<LD	9,6
Mínimo	<LD	0,013	0,004	0,080	2,1	2	<LD	0,2	0,02	<LD	2,2
Máximo	0,8	0,117	0,051	0,154	17,3	12	0,007	11,2	0,23	<LD	11,6
Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
Mediana	<LD	<LD	<LD	<LD	0,04	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,2
Mínimo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Máximo	<LD	<LD	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,2

LD= limite de detecção

Em linhas gerais, as concentrações de metais nos siris coletados nesta região foram menores do que aquelas obtidas no estuário de Santos. Este resultado era esperado, já que foram consideradas duas áreas com distinta qualidade ambiental. Na Constituição do estado do Rio de Janeiro (artigo 266), a Ilha Grande (RJ) é oficialmente declarada como uma área de proteção ambiental. Nela, foi criado pelo Decreto 15273 de 28 de junho de 1971 um parque estadual com o mesmo nome, objetivando a proteção da biodiversidade e o incentivo do turismo (Alho et al., 2002). Mesmo com ocupação humana, o seu grau de

conservação permitiu que muitos estudos utilizassem este local como área de referência, situação oposta a que ocorre com o estuário de Santos.

Os dados de amostras de siris coletadas em Ilha Grande em março/2013 também foram inseridos junto à base prévia de dados (sirís e sedimento – coletas de agosto e dezembro/2011).

Dessa forma, são apresentados gráficos de dispersão dos dados da função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III (FIG. 17 a,b – Ilha Grande). Na FIG. 17b, os dados referentes à base de dados, assim como a elipse de confiança e os dados de sedimento, também foram retirados para facilitar a avaliação.

De acordo com os dados descritivos (TAB. 27), a função I foi novamente responsável pela separação dos dados de tecido e sedimento. O coeficiente de Zn permaneceu contribuindo fortemente no poder discriminante da função II. Como pode ser observado pelos gráficos de função II *versus* função III, não se verificou sobreposição dos dados dos sirís coletados em Ilha Grande com a base prévia de dados (FIG. 17b). Logo, o modelo permitiu distinguir regiões diferentes, com diferentes níveis de contaminação.

FIGURA 17: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas em Ilha Grande em março/2013 (M_RJ= músculo; H_RJ= hepatopâncreas; B_RJ= brânquias). As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%.

TABELA 27: Parâmetros da análise discriminante realizada com os dados das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados de concentração de metais das amostras de tecidos de siris (n=18) coletados em Ilha Grande em março/2013.

Wilks' λ : 0,02		p<0,0000	
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	18,48	5,42	1,77
Variância acumulada	0,71	0,92	0,99
χ^2	3458,6*	1768,9*	710,2*
Graus de liberdade	66	50	36
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Ni	-0,29	0,29	0,30
Fe	0,31	0,69	0,05
Zn	0,68	-1,37	0,82
Pb	-0,65	0,48	-0,97
Cu	0,18	0,52	0,34
Al	0,63	-0,20	-0,05
Mn	-0,31	0,35	0,32
Cd	0,44	-0,26	0,29
Co	-0,40	-0,06	0,13
Cr	-0,57	0,06	0,22
Hg	0,13	-0,09	-0,50
	Média das variáveis canônicas		
Brânquias	1,82	3,10	-0,09
Hepato	1,69	-0,64	1,27
Músculos	0,96	-2,79	-0,81
Sedimento	-13,03	0,31	0,75
Brânquias_RJ	-1,86	0,16	-2,75
Hepato_RJ	-0,25	3,09	-3,66
Músculos_RJ	-5,07	2,24	-8,04

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

- Sensibilidade às alterações nos níveis de metais por tecido

Dando continuidade aos procedimentos de validação do modelo, foi testada a sensibilidade às alterações nas concentrações de metais por tipo de tecido. Para este fim, foram realizadas simulações baseadas nos dados de concentração de metais dos tecidos de siris coletados no estuário de Santos em março/2013. Esses dados foram modificados até simular condições extremas em cada tecido, separadamente. Desta forma, os dados foram testados até o valor onde se observasse alterações na conformação do modelo. Era esperado que concentrações limítrofes (aqui consideradas os limites de detecção do modelo) fossem diferentes para cada tecido. Os elementos Cd e Pb foram selecionados aleatoriamente para esta avaliação.

Quanto ao Cd, os dados de concentração nas brânquias foram multiplicados por 0,5 ($0,007-0,022 \mu\text{g g}^{-1}$), 2 ($0,026-0,086 \mu\text{g g}^{-1}$), 5 ($0,065-0,215 \mu\text{g g}^{-1}$), 10 ($0,130-0,430 \mu\text{g g}^{-1}$), 20 ($0,260-0,860 \mu\text{g g}^{-1}$), 40 ($0,520-1,720 \mu\text{g g}^{-1}$) e 100 ($1,300-4,300 \mu\text{g g}^{-1}$), simulando alterações na concentração de Cd deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

FIGURA 18: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013 (M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 0,5. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 19: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 2. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 20: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 5. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 21: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 10. As elipses são referentes à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 22: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 23: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 40. As elipses referem-se à base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 24: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nas brânquias multiplicados por 100. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

Na maioria das simulações com os dados de brânquias, a distribuição dos dados de hepatopâncreas e músculos se mostrou inalterada. Foi observado que os dados alterados de brânquias começam a não sobrepor com a prévia base de dados a partir da multiplicação em 100 vezes ($1,300\text{--}4,300\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), alterando inclusive a distribuição da base de dados. Os resultados dessas simulações sugerem que apenas variações muito bruscas nas concentrações de metais nas brânquias seriam capazes de alterar a assinatura química do estuário. Sabendo-se que este tecido é mais suscetível às alterações nas condições físico-químicas da água (comuns em ambientes estuarinos), é possível que o que foi observado nesta simulação ocorra frequentemente. Todavia, o modelo pode retornar a sua conformação padrão rapidamente, visto a existência de mecanismos já descritos que permitem o controle da concentração de metais neste tecido. Assim, alterações nas concentrações das brânquias devem ser consideradas com cautela na avaliação de alterações do modelo.

Os dados de concentração de Cd nos hepatopâncreas foram multiplicados por 0,5 (0,010-0,092 $\mu\text{g g}^{-1}$), 2 (0,040-0,366 $\mu\text{g g}^{-1}$), 5 (0,100-0,915 $\mu\text{g g}^{-1}$), 10 (0,200-1,830 $\mu\text{g g}^{-1}$) e 20 (0,400-3,660 $\mu\text{g g}^{-1}$), simulando alterações consideráveis na concentração de Cd deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 25, 26, 27, 28 e 29.

FIGURA 25: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 26: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 27: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 28: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 29: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd no hepatopâncreas multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

Em todas as simulações com os dados de hepatopâncreas, a distribuição dos dados de brânquias e músculos se mostrou inalterada. Foi observado que os dados de hepatopâncreas começam a não sobrepor com as elipses a partir da multiplicação em 20 vezes ($0,400\text{-}3,660\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$). Na avaliação do modelo, isso mostrou uma sensibilidade muito maior deste tecido às alterações de concentração de Cd do que as brânquias. Os resultados sugerem que, por ser um órgão detoxificador, o hepatopâncreas detecta muito mais rapidamente uma alteração no estuário.

Os dados de concentração de Cd nos músculos foram multiplicados por 0,5 (0,001-0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$), 2 (0,004-0,072 $\mu\text{g g}^{-1}$), 5 (0,010-0,180 $\mu\text{g g}^{-1}$), 10 (0,020-0,360 $\mu\text{g g}^{-1}$), 20 (0,040-0,720 $\mu\text{g g}^{-1}$), 40 (0,080-1,440 $\mu\text{g g}^{-1}$) e 100 (0,200-3,600 $\mu\text{g g}^{-1}$), simulando alterações consideráveis na concentração de Cd deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36.

FIGURA 30: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 31: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 32: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 33: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 34: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 35: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 40. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 36: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Cd nos músculos multiplicados por 100. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

Em todas as simulações com os dados de músculos, a distribuição dos dados de hepatopâncreas e brânquias se mostrou inalterada. Foi observado que os dados de músculos começam a não sobrepor com as elipses a partir da multiplicação em 100 vezes ($0,200-3,600 \mu\text{g g}^{-1}$), mostrando uma sensibilidade muito menor às alterações de Cd do que o hepatopâncreas, principalmente. Este resultado confirma que, para que ocorra uma contaminação dos músculos, uma concentração muito elevada de metais tem que conseguir ser acumulado neste tecido, descontando todas as perdas que possam ocorrer por processos metabólicos. Assim, alterações no modelo proposto avaliadas por este tecido também devem ser consideradas com cautela.

Com relação ao Pb, os dados de concentração nas brânquias foram multiplicados por 0,5 (0,097-0,475 $\mu\text{g g}^{-1}$), 2 (0,386-1,898 $\mu\text{g g}^{-1}$), 5 (0,965-4,745 $\mu\text{g g}^{-1}$) e 10 (1,930-9,490 $\mu\text{g g}^{-1}$), simulando alterações consideráveis na concentração de Pb deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 37, 38, 39 e 40.

FIGURA 37: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 38: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 39: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 40: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nas brânquias multiplicados por 10. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

A distribuição dos dados de hepatopâncreas e músculos se mostrou inalterada em todas as simulações, como era esperado. Observou-se que os dados de brânquias começam a não sobrepor com as elipses a partir da multiplicação em 10 vezes ($1,930-9,490 \mu\text{g g}^{-1}$). Similar ao que aconteceu com o Cd, os resultados da presente análise confirmam a necessidade de cautela ao inferir alterações no modelo pelo uso apenas deste tecido.

Os dados de concentração de Pb no hepatopâncreas foram multiplicados por 0,5 (0,056-0,109 $\mu\text{g g}^{-1}$), 2 (0,224-0,436 $\mu\text{g g}^{-1}$) e 5 (0,560-1,090 $\mu\text{g g}^{-1}$), simulando alterações consideráveis concentração de Pb deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 41, 42 e 43.

FIGURA 41: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 42: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 43: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb no hepatopâncreas multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

A distribuição dos dados de brânquias e músculos se mostrou inalterada em todas as simulações. Observou-se que os dados de hepatopâncreas começam a não sobrepor com as elipses a partir da multiplicação em 5 vezes ($0,560\text{--}1,090\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), mostrando uma sensibilidade muito maior a alterações de Pb do que as brânquias. Devido ao resultado similar ao observado para Cd, a presente análise confirma novamente que o hepatopâncreas detecta muito mais rapidamente uma alteração no estuário.

Os dados de concentração de Pb nos músculos foram multiplicados por 0,5 ($0,021\text{--}0,068\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), 2 ($0,082\text{--}0,272\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), 5 ($0,205\text{--}0,680\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), 10 ($0,410\text{--}1,360\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) e 20 ($0,820\text{--}2,720\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) simulando alterações consideráveis na concentração de Pb deste tecido. Os resultados são apresentados nas FIG. 44, 45, 46, 47 e 48.

FIGURA 44: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 0,5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 45: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 2. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 46: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013(M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 5. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 47: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos de *C. danae* (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013 (M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 10. As elipses são referentes aos dados de agosto e dezembro/2011 e indicam nível de confiabilidade de 95%

FIGURA 48: Função discriminante I *versus* função discriminante II (a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de amostras de tecidos (M= músculo; H=hepatopâncreas; B=brânquias) e de sedimento (S) da base prévia de dados, com adição dos dados das amostras de siris coletadas no estuário de Santos em março/2013 (M_SP= músculo; H_SP=hepatopâncreas; B_SP=brânquias), com dados de Pb nos músculos multiplicados por 20. As elipses referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

A distribuição dos dados de hepatopâncreas e brânquias se mostrou inalterada em todas as simulações. Observou-se que os dados de músculos começam a não sobrepor com as elipses a partir da multiplicação em 20 vezes ($0,820\text{--}2,720\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), mostrando uma sensibilidade muito menor às alterações de Pb do que as brânquias e principalmente, do que hepatopâncreas.

Os resultados destas simulações demonstraram que cada tecido teve uma sensibilidade diferente às alterações nas concentrações de Cd e Pb, sendo o hepatopâncreas o tecido mais sensível, seguido do músculo e depois, das brânquias.

Para o elemento Cd, as concentrações para possíveis alterações no modelo foram consideravelmente maiores que as de Pb. Isso demonstra particularidades na absorção de cada metal em cada tecido, como previamente reportado por Rainbow (2002).

No geral, são necessárias alterações drásticas nessas concentrações de modo a realmente alterar o modelo estabelecido. A avaliação também mostrou que há um limite de detecção para cada tecido estudado, i.e., pode-se dizer que há uma concentração específica, provavelmente ligada à absorção em cada tecido, até a qual o equilíbrio do modelo não é quebrado. Porém, considerando-se a própria função biológica em cada tecido, os resultados sugerem prudência na avaliação utilizando dados de apenas um tipo de tecido. Isto reforça a robustez da avaliação conjunta dos três tecidos quando utilizado o modelo para se obter uma melhor interpretação de dados.

7.3.4. Avaliação das concentrações de metais das amostras de tecidos de siris e de sedimento coletados no estuário de Santos, por área de coleta (agosto e dezembro/2011): identificação de fontes de emissão

Como consequência dos resultados anteriormente obtidos e de modo a estudar a assinatura química identificada para o estuário de Santos em maiores detalhes, foi realizada uma avaliação do comportamento desta assinatura por área de coleta. Numa primeira hipótese, apesar das diferenças de concentração entre sedimento e tecidos, este sistema seria sensível às alterações na assinatura química atribuída ao estuário, podendo trazer evidências de atividades de fonte de emissão de metais próximas às áreas de coleta.

Para tanto, os dados de tecidos e de sedimentos de pontos de coletas de um mesmo canal foram separados em três áreas (área 1: canal de São Vicente, área 2: região próxima ao polo de Cubatão, área 3: canal de Santos) e estudados nos respectivos períodos de coleta (agosto e dezembro/2011).

Nas TAB. 28 (a,b,c) e 29 (a,b,c) são apresentados as medianas das concentrações de tecidos de siris e sedimentos por área, assim como os valores máximos e mínimos obtidos, referentes aos períodos de agosto e dezembro/2011, respectivamente.

Com exceção de Cu, Fe, Hg, Mn e Zn, as concentrações obtidas para os demais metais em tecidos de siris variaram muito numa mesma área de agosto para dezembro/2011. Já para sedimento, as concentrações obtidas pouco variaram numa mesma área, nos períodos estudados.

TABELA 28: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais nas brânquias, hepatopâncreas, músculos (base úmida; n= 246) e sedimento (n=54) nas áreas 1 (canal de São Vicente- a), 2 (região próxima ao polo de Cubatão- b) e 3 (canal de Santos- c) no período de agosto/2011

Área 1 (a): Canal de S. Vicente	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	29,0	0,012	0,073	0,095	40,3	95	0,02	13,0	0,21	0,129	15,0
	Mín	1,5	0,009	0,029	<LD	17,3	26	<LD	2,9	0,14	0,011	10,7
	Máx.	1131,7	0,073	0,450	3,888	71,8	456	0,03	84,9	14,74	4,741	19,4
	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	6,1	0,029	0,151	0,141	16,8	42	0,04	6,3	0,47	0,051	35,2
	Mín	<LD	0,004	0,014	<LD	3,1	11	<LD	2,0	0,15	0,008	13,8
	Máx.	271,0	0,053	0,403	6,654	81,1	194	0,09	48,7	2,78	1,014	70,7
	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	4,1	0,004	0,018	0,083	7,3	12	0,06	1,6	0,15	0,010	28,5
Área 2 (b): Região próx. Polo de Cubatão	Mín	<LD	0,003	0,013	<LD	3,1	<LD	<LD	0,6	0,08	<LD	20,2
	Máx.	40,1	0,006	0,037	0,230	17,0	56	0,13	31,5	0,23	0,131	47,0
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	0,40	<LD	2,0	3,9	3,8	0,21	0,08	29,8	3,65	2,2	8,9
	Mín	0,30	<LD	<LD	3,5	<LD	0,18	0,06	17,5	<LD	<LD	6,0
	Máx.	1,31	<LD	4,4	11,9	5,9	0,87	0,40	71,5	7,47	2,3	23,3
	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	27,5	0,029	0,065	0,094	46,5	246	0,02	8,7	0,25	0,213	17,0
	Mín	3,1	0,017	0,011	<LD	19,8	53	<LD	1,4	0,13	0,026	7,8
	Máx.	231,2	0,083	70,496	0,399	80,2	792	0,04	59,4	0,33	0,975	29,9
Área 3 (c): Canal de Santos	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	5,7	0,068	0,281	0,113	38,2	78	0,07	5,4	0,47	0,056	37,6
	Mín	<LD	0,017	0,097	0,047	5,9	15	<LD	2,6	0,23	<LD	25,9
	Máx.	60,6	0,256	0,484	0,290	157,1	152	0,10	58,6	1,66	0,126	77,1
	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	3,4	0,004	0,018	0,099	9,1	13	0,10	0,8	0,17	0,035	27,2
	Mín	<LD	0,003	0,009	<LD	4,3	<LD	0,05	0,5	<LD	<LD	16,4
	Máx.	12,4	0,024	0,042	0,272	16,4	119	0,27	3,4	0,26	0,049	38,1
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	4,85	2,06	12,8	72,4	31,1	5,95	0,98	666,2	33,41	68,2	218,2
Área 3 (c): Canal de Santos	Mín	3,57	<LD	8,8	41,1	26,0	3,41	0,61	399,3	27,55	15,9	90,1
	Máx.	7,34	3,27	15,4	76,3	142,5	13,83	1,96	2858,3	63,93	253,1	1322,1
	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	29,9	0,023	0,064	0,120	43,5	78	0,02	7,1	0,19	0,101	15,1
	Mín	<LD	0,014	0,026	<LD	18,9	21	<LD	2,9	0,05	0,026	7,6
	Máx.	350,5	0,033	0,421	0,567	61,9	840	0,06	29,6	0,29	1,579	22,7
	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	2,9	0,052	0,163	0,107	23,5	30	0,04	4,2	0,42	0,064	31,9
	Mín	<LD	0,010	0,083	0,043	7,7	18	<LD	1,9	0,10	0,021	18,7
	Máx.	9,8	0,365	0,361	0,918	77,7	90	0,14	31,1	1,09	0,321	87,8
Área 3 (c): Canal de Santos	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	3,4	0,007	0,021	0,118	11,0	12	0,08	1,2	0,12	0,024	28,2
	Mín	<LD	0,004	0,014	<LD	8,6	<LD	0,04	0,7	0,05	0,008	17,8
	Máx.	9,4	0,019	0,062	4,416	18,3	771	0,34	4,4	0,28	0,045	39,2
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	1,46	0,10	5,2	17,8	11,1	1,13	0,32	180,6	8,72	10,1	53,3
	Mín	0,69	<LD	4,0	10,7	4,4	0,67	0,13	98,3	<LD	3,6	21,7
	Máx.	3,29	0,18	10,3	34,5	16,4	2,89	0,56	398,1	17,63	16,9	117,6

LD = limite de detecção

TABELA 29: Medianas, valores mínimos e máximos das concentrações de metais nas brânquias, hepatopâncreas, músculos (base úmida; n=258) e sedimento (n=54) nas áreas 1 (canal de São Vicente- a), 2 (região próxima ao polo de Cubatão- b) e 3 (canal de Santos- c) no período de dezembro/2011.

Área 1 (a): Canal de S. Vicente	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	106,4	<LD	<LD	0,433	31,1	114	0,02	26,4	<LD	<LD	12,4
	Mín	30,0	<LD	<LD	<LD	13,2	21	<LD	5,5	<LD	<LD	5,9
	Máx.	550,2	<LD	<LD	0,903	63,1	365	0,03	193,0	<LD	<LD	20,7
	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	26,9	<LD	<LD	0,874	20,3	47	0,03	10,5	0,400	<LD	31,1
	Mín	16,8	<LD	<LD	<LD	7,7	21	<LD	4,5	<LD	<LD	21,4
	Máx.	123,9	<LD	<LD	2,834	113,7	98	0,10	105,8	0,819	<LD	48,9
	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	13,0	<LD	<LD	0,449	9,4	10	0,05	2,2	<LD	<LD	22,8
Área 2 (b): Região próx. Polo de Cubatão	Mín	8,3	<LD	<LD	<LD	5,2	<LD	<LD	1,7	<LD	<LD	16,2
	Máx.	21,7	<LD	<LD	0,643	16,2	13	0,09	12,9	<LD	<LD	33,4
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	1,03	<LD	4,0	11,1	4,0	0,65	<LD	88,3	3,73	3,3	22,5
	Mín	0,20	<LD	2,3	3,3	<LD	0,11	<LD	13,2	<LD	<LD	5,1
	Máx.	1,38	<LD	4,7	15,5	5,1	0,92	<LD	103,8	6,70	5,8	26,9
	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	130,6	<LD	0,400	0,496	41,0	330	0,02	24,2	<LD	0,400	18,0
	Mín	14,5	<LD	<LD	<LD	14,8	58	<LD	4,9	<LD	<LD	6,7
	Máx.	550,9	<LD	0,437	1,285	71,7	820	0,12	190,6	<LD	4,555	39,0
Área 3 (c): Canal de Santos	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	25,5	0,400	0,400	0,720	33,8	56	0,05	7,3	0,400	<LD	34,3
	Mín	9,2	<LD	<LD	<LD	8,3	21	<LD	1,9	<LD	<LD	10,4
	Máx.	105,9	0,761	0,814	4,847	186,8	242	0,28	51,5	2,365	<LD	261,3
	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	11,8	<LD	<LD	0,479	9,5	10	0,12	2,2	<LD	<LD	23,2
	Mín	7,6	<LD	<LD	<LD	5,7	<LD	0,05	1,5	<LD	<LD	17,8
	Máx.	73,2	<LD	<LD	0,699	12,8	29	0,48	7,7	<LD	<LD	36,0
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	3,35	0,17	10,1	35,5	23,3	3,51	0,62	354,6	22,90	30,3	168,0
Área 3 (c): Canal de Santos	Mín	2,77	<LD	8,5	33,4	22,0	2,39	0,47	244,1	21,55	10,0	88,2
	Máx.	7,97	3,41	11,9	89,9	34,7	5,97	2,67	612,8	37,16	76,3	233,2
	Brânquias	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	120,5	<LD	<LD	0,465	43,6	292	0,04	7,7	<LD	0,400	16,9
	Mín	31,9	<LD	<LD	<LD	17,9	42	<LD	2,7	<LD	<LD	6,3
	Máx.	816,5	<LD	<LD	1,309	71,7	789	0,09	50,2	<LD	5,824	37,3
	Hepato	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	23,7	0,400	<LD	0,682	34,2	53	0,06	5,3	0,400	<LD	32,5
	Mín	11,8	<LD	<LD	<LD	9,8	20	0,03	2,1	<LD	<LD	20,8
	Máx.	107,5	0,423	<LD	1,948	150,6	94	0,25	16,1	1,047	<LD	125,6
Área 3 (c): Canal de Santos	Músculos	Al $\mu\text{g g}^{-1}$	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$
	Mediana	12,6	<LD	<LD	0,443	9,4	10	0,13	2,0	<LD	<LD	25,8
	Mín	8,0	<LD	<LD	<LD	4,2	<LD	0,05	1,3	<LD	<LD	18,9
	Máx.	20,0	<LD	<LD	0,947	15,3	12	0,32	4,7	<LD	<LD	34,6
	Sedimento	Al %	Cd $\mu\text{g g}^{-1}$	Co $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	Cu $\mu\text{g g}^{-1}$	Fe %	Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Ni $\mu\text{g g}^{-1}$	Pb $\mu\text{g g}^{-1}$	Zn $\mu\text{g g}^{-1}$

Mediana	1,57	0,10	6,0	20,7	5,2	1,09	0,12	163,4	8,73	5,6	35,6
Mín	0,89	<LD	5,0	12,7	4,3	0,82	<LD	96,4	6,81	3,4	21,3
Máx.	2,13	0,13	7,8	27,5	18,4	1,91	0,37	274,1	13,42	20,4	78,2

LD= limite de detecção

Prosseguindo com o tratamento e interpretação de dados, a análise discriminante foi aplicada com o objetivo de identificar possíveis alterações na assinatura química por área nos períodos de estudo. De modo a facilitar a leitura, os gráficos de função I *versus* função II e de função II *versus* função III por área são apresentados nas FIG. 49 (a, b, c, d), 50 (a, b, c, d) e 51 (a, b, c, d) referentes as áreas 1, 2 e 3, respectivamente, nos períodos de agosto e dezembro/2011. Os dados descritivos dessas análises são apresentados nos APÊNDICES C (área 1: agosto e dezembro/2011); D (área 2: agosto e dezembro/2011); e E (área 3: agosto e dezembro/2011).

Para a área 1 (canal de São Vicente), observou-se que a separação das amostras de tecidos de siris e de sedimentos foi influenciada pelos coeficientes de Co e Fe em agosto/2011; e de Co, Ni e Pb em dezembro/2011 (FIG.49 a,c). Observando as TAB. 28a e 29a, confirmou-se que a função I representou a diferença em magnitude das concentrações de tecidos e sedimento, permitindo a sua separação.

No que diz respeito à função II (FIG.49 b,d), os coeficientes de Fe e Zn influenciaram a separação dos dados de brânquias e de músculos, em ambos os períodos. Este resultado era esperado, conforme testes anteriormente realizados e pela literatura revisada.

Já a função III, que distinguiu hepatopâncreas e onde se observa a correspondência com os dados de sedimento, observou-se que o coeficiente de Cd e os de Cr e Pb influenciaram a separação dos dados em agosto/2011 e dezembro/2011, respectivamente. Na FIG. 49b, observou-se uma inversão do posicionamento dos dados de brânquias e músculos em agosto/2011 em comparação ao modelo gerado com todos os dados deste trabalho (FIG.14b). Os resultados sugeriram que a influência do coeficiente de Cd em agosto/2011 alterou a estabilidade do modelo, diferente dos coeficientes de Cr e Ni que, apesar de serem elementos não-essenciais aos siris e não terem sido detectados

em baixas concentrações no sedimento, não alteraram a distribuição dos dados na análise discriminante.

O resultados sugeriram que essa entrada de Cd em agosto/2001 (mesmo em concentrações muito baixas) foi capaz de desestabilizar a assinatura do estuário.

Nas TAB. 28a e 29a, as amostras de sedimento apresentaram concentrações de Cd abaixo do limite de detecção e este elemento apenas foi detectado nos tecidos de agosto/2011 (TAB. 28a).

Segundo o relatório CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001), os elementos Cr e Ni constituem parte do efluente da empresa CIEL (ANEXOS A e B), que não possui Cd. Esta é uma empresa de beneficiamento de coque verde, estabelecida no estuário há alguns anos.

Apesar de não terem sido encontrados altos níveis destes metais nem no sedimento e nem nos siris em ambos os períodos, foi possível identifica-los em dezembro/2011, sem alterações no modelo (i.e., sem entrada de novas fontes de metais).

FIGURA 49: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 1 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

Para área 2 (região próxima ao polo de Cubatão), o padrão de distribuição de dados para ambos os períodos foi bastante similar (FIG. 50 a-d), apesar de diferenças nos discriminantes. A separação de tecidos e sedimentos na função I foi influenciada pelos coeficientes de Cr, Pb e Cd em agosto/2011; e de Co e Cd em dezembro/2011 (FIG.50 a,c). A separação de brânquias e músculos na função II foi influenciada pelo coeficiente de Zn em agosto/2011 e pelos de Fe e Hg em dezembro/2011 (FIG. 50 b,d).

Como já reportado neste trabalho, a influência de Fe e Zn no transporte de metais no organismo é esperado. Segundo diversos trabalhos prévios, a entrada de Hg no organismo ocorre predominantemente por via alimentar, com maior acumulação nos músculos. Visto que não houve variação na concentração de Hg nas brânquias de ambos os períodos e que o valor máximo detectado de Hg em músculos de dezembro/2011 foi o dobro do observado em agosto/2011 (TAB. 28b e 29b), os resultados sugeriram que houve a entrada de Hg nos organismos em dezembro/2011. Essa entrada pode ser confirmada pela função III (FIG.50 b,d), que separa hepatopâncreas no modelo pela influência dos coeficientes de Cd, Pb e Zn em agosto/2011; e de Hg e Cr em dezembro/2011. De acordo com o relatório de CETESB 2001 (e valendo-se da proximidade com os pontos de coleta deste trabalho), Cd, Pb e Zn são encontrados nos efluentes da COSIPA (atual USIMINAS), grande siderúrgica da região. Ainda segundo relatório, Hg e Cr também são encontrados nos efluentes da COSIPA. Entretanto, diversos trabalhos (Siqueira et al. 2004b; Siqueira et al. 2005) reportam que o Hg encontrado nesta região é proveniente dos efluentes da CARBOCLORO (empresa que, em suas unidades eletrolíticas de fabricação de clorosoda, utilizam eletrodos a base de mercúrio) (ANEXOS A e B).

FIGURA 50: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 2 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

Na área 3 (canal de Santos), o padrão de distribuição de dados para ambos os períodos também foi bastante similar, apesar de diferenças nos discriminantes (FIG.51 a-d). A separação de tecidos e sedimentos na função I foi influenciada pelos coeficientes de Co em agosto/2011 e de Co e Cd em dezembro/2011 (FIG.51 a,c). A separação de brânquias e músculos na função II foi influenciada pelos coeficientes de Zn e Cu em agosto/2011 e pelos de Fe, Mn e Zn em dezembro/2011. Com exceção do Mn, a influência de Cu, Fe e Zn já era esperada nesta análise. Entretanto, nos dados de concentrações por tecido (TAB.29c), as brânquias apresentaram maior concentração de Mn em comparação aos demais tecidos, o que provavelmente causou a separação na função II em dezembro/2011. Segundo o relatório da CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001), Mn é um dos elementos que compõe os efluentes da indústria DOW QUÍMICA (produtora de polímeros) e dos terminais portuários da ilha Barnabé (ANEXOS A, B e C).

Já na função III, a identificação do hepatopâncreas foi influenciada pelos coeficientes de Ni em agosto/2011 e pelos de Al e Cr em dezembro/2011. Quanto ao elemento Al, não há referências em Lamparelli et al. (2001) de sua presença em efluentes no estuário de Santos, mas sabe-se que alumino-silicatos são os principais constituintes da fração fina (silte-argila) dos sedimentos com a qual os metais estão associados (Hortellani et al., 2008). Segundo este relatório, os elementos Ni e Cr são compostos presentes nos efluentes da empresa DOW QUÍMICA (ANEXOS A e B).

FIGURA 51: Função discriminante I *versus* função discriminante II e função discriminante II *versus* função discriminante III, respectivamente, das análises discriminantes dos dados de amostras de tecidos de siris e de sedimento coletadas na área 3 em agosto/2011(a,b) e dezembro/2011(c,d). As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

Foi verificado um padrão de distribuição que pôde ser confirmado como a assinatura química do estuário de Santos. A modificação deste padrão de distribuição na área 1 (canal de São Vicente) de agosto para dezembro/2011 (FIG. 49 b,d) sugere que o modelo por área de coleta seja mais sensível que aquele elaborado com o uso dos dados totais (FIG. 14 e 15), possibilitando a averiguação de entrada e saída de fontes eventuais ou desconhecidas de emissão de metais. Além disso, pela avaliação dos coeficientes que separaram o hepatopâncreas na análise discriminante foi possível identificar evidências de fontes próximas de emissão de metais. Não foi encontrado nenhum outro trabalho que investigasse os tecidos de siris e sua relação com o sedimento para identificação de fontes de contaminação.

Estudos como de Luiz-Silva et al. (2012a, 2012b) priorizaram a assinatura geoquímica do sedimento para evidenciar a entrada de compostos em função da instalação da atividade industrial e a crescente influência de determinadas atividades no lançamento de metais, como a siderurgia. O modelo de assinatura química proposto no presente trabalho vem complementar este tipo de abordagem, incluindo o modelo biológico e sua capacidade de também identificar essa influência das atividades industriais como um sistema, e não apenas um único compartimento ambiental.

7.3.5. Validação do modelo para assinaturas químicas e simulações por área de coleta.

De forma a aprimorar os procedimentos de validação do modelo, foram realizadas novas simulações com os dados de tecidos e sedimento por área de coleta. Primeiramente, os dados foram analisados graficamente por área (1- C. de São Vicente; 2- Próximo a Cubatão; 3- C. de Santos), independente do período coletado (agosto e dezembro/2011) e das alterações temporais observadas. Gráficos de dispersão de função discriminante I *versus* função discriminante II são apresentados nas FIG. 52 (área 1), 53 (área 2) e 54 (área 3).

FIGURA 52: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 1- Canal de São Vicente. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 53: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 2- Próximo ao Pólo de Cubatão. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 54: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) coletadas em agosto e dezembro/2011 na área 3- Canal de Santos. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

Foi possível observar que a distribuição gráfica de todos os dados se manteve bastante similar ao padrão de assinatura observado, mesmo na área 1 (confirmando que a entrada de Cd em agosto/2011 realmente alterou o modelo regional na análise temporal) (FIG. 48 b). Isso demonstrou mais uma vez a sensibilidade do modelo quando utilizado por área em períodos distintos de coleta.

Desta forma, foram adicionados aos modelos regionais os novos dados de amostras de siris coletadas em março/2013 no estuário de Santos. Esta análise teve como objetivo refinar a análise dos dados por área, assegurando ainda mais o caráter definitivo do siri como biomonitor. Gráficos de dispersão de função discriminante I *versus* função discriminante II são apresentados nas FIG. 55 (área 1), 56 (área 2) e 57 (área 3).

FIGURA 55: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 1 (Canal de São Vicente), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 56: Função discriminante I versus função discriminante II(a) e função discriminante II versus função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 2 (Próximo ao Pólo de Cubatão), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

FIGURA 57: Função discriminante I versus função discriminante II(a) e função discriminante II versus função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 3 (Canal de Santos), com adição das amostras de siris coletados no estuário de Santos em março/2013 (B_SP=brânquias; H_SP=hepatopâncreas; M_SP= músculo). As elipses são referem-se a base prévia e indicam nível de confiabilidade de 95%.

Em todos os modelos, os novos dados ficaram fora das elipses de confiança, o que sugeriria que essas amostras coletadas em 2013 não seriam de nenhuma das regiões do estuário de Santos. Avaliando os resultados gráficos, observou-se que a única região que manteve a conformação gráfica da assinatura química obtida com a adição de novos dados foi a área 2- próximo ao pólo de Cubatão. Além disso, os novos dados de brânquias da referida área permaneceram dentro da elipse de confiança da base prévia de dados. Para as outras duas áreas, a conformação da base de dados também foi alterada.

Investigando com maior profundidade os resultados encontrados para a área 2 (próximo ao pólo de Cubatão), os dados de março/2013 foram unidos aos demais dados desta área e uma nova análise discriminante foi gerada. Gráficos de dispersão de função discriminante I *versus* função discriminante II são apresentados na FIG. 58.

FIGURA 58: Função discriminante I *versus* função discriminante II(a) e função discriminante II *versus* função discriminante III (b) dos dados de tecidos de *C. danae* (B=brânquias; H=hepatopâncreas; M=músculo) e de sedimento (S) da base prévia de dados na área 2 (Próximo ao Pólo de Cubatão), considerando os dados de março/2013 como parte integrante desta base. As elipses indicam nível de confiabilidade de 95%.

Considerando os dados de março/2013 como parte integrante da base de dados da área 2, observou-se que a distribuição gráfica dos dados manteve-se bastante similar ao padrão de assinatura química observado para o estuário de

Santos, confirmando que é muito provável que esta amostra tenha sido coletada nas proximidades da área 2.

Além de permitir assegurar o caráter definitivo do siri *C. danae* como biomonitor, esse tipo de análise pode vir a ser de muita importância no que diz respeito à análise de amostras cuja origem seja desconhecida. Também é possível avaliar se pequenas modificações na conformação da assinatura correspondem a alterações ambientais prioritárias na investigação de alterações nas emissões já existentes no estuário.

8. CONCLUSÕES

Etapa 1: A partir dos resultados, concluiu-se que ainda há uma disseminação generalizada e complexa de metais no sedimento do sistema estuarino de Santos – São Vicente. Concentrações de metais acima dos níveis indicados pela legislação canadense foram registradas em algumas amostras. A estratégia de uso em sequência dos métodos estatísticos se mostrou adequada. A realização da correlação de Pearson não foi suficiente para a observação de padrões de distribuição entre as variáveis. Posteriormente, a ACP agrupou locais próximos de importantes atividades industriais, onde os metais foram encontrados em concentrações elevadas. Confirmando os resultados obtidos por meio da ACP, a análise de cluster possibilitou a caracterização dos grupos de pontos e principais metais correlacionados a estes grupos.

Etapa 2: As concentrações de metais obtidas para *C. danae* estiveram de acordo com os dados de estudos anteriores. A separação dos dados de brânquias, hepatopâncreas e músculos na análise de componentes principais sugeriu uma acumulação diferenciada dos metais em cada tecido. Numa perspectiva toxicológica, as concentrações da maioria dos metais estiveram abaixo dos níveis considerados pela legislação brasileira e européia. No geral, foi possível afirmar que as análises de *C. danae* confirmaram a presença de todos os metais de interesse nos tecidos estudados.

Etapa 3: O siri azul da espécie *C. danae* pôde ser considerado um biomonitor de caráter definitivo no que diz respeito ao conceito proposto pioneiramente por este trabalho.

Como resultado dos procedimentos criados para a validação do modelo estabelecido, foram confirmadas a sua robustez em função do tempo e a sua especificidade em função do local. O modelo distinguiu as amostras de outra região que não do estuário (Ilha Grande), o que possivelmente não ocorreria com o uso de apenas um tecido.

Na avaliação desses dados conforme as áreas de coleta, foi possível verificar indícios de fontes emissoras próximas por meio dos coeficientes que permitiram a separação dos dados de hepatopâncreas na análise discriminante.

Nas simulações com uso de concentrações extremas de Cd e Pb nos tecidos, observou-se sensibilidades distintas para cada tipo de metal nos diferentes tecidos e isso pode influir na estabilidade do modelo estabelecido. Também houve a confirmação do hepatopâncreas como tecido mais sensível às variações extremas de concentração de metais, sendo mais segura a avaliação conjunta dos três tecidos quando utilizado o modelo proposto por este trabalho.

Assim, a análise discriminante pôde ser utilizada como ferramenta para avaliar o caráter definitivo dado ao siri como biomonitor.

Embora não investigado no âmbito deste trabalho, a acumulação diferenciada nos três tecidos pode vir a ser uma importante ferramenta no levantamento de indícios de temporalidade do descarte. A robustez do modelo aqui apresentado irá aumentar com novas coletas e a realimentação do banco de dados.

Acredita-se que os resultados apresentados podem permitir uma nova discussão sobre o uso de biomonitores no monitoramento ambiental, com o refinamento da análise de dados para este propósito. Espera-se que esta abordagem possa, futuramente, ser útil no que se refere às questões de lançamentos irregulares e crimes contra a natureza em regiões com dinâmicas complexas como o estuário de Santos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.S. **Avaliação da Qualidade de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil**. 2002. Tese (Doutorado)-Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ABESSA, D.M.S; CARR R.S.; RACHID, B.R.F; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A.; SARKIS, J. E Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Mar. Pollut. Bull.**, v.50, n.8, p. 875-885,2005.

AHEARN, G.A; MANDAL, P. K.; MANDAL, A. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. **J. Comp. Physiol. B** , v. 174, p. 439–452, 2004.

ALHO, C. J. R.; SCHNEIDER, M.; VASCONCELLOS, L. A. Degree of threat to the biological diversity in the Ilha Grande state park (rj) and guidelines for conservation. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 3, p. 375-385, 2002.

ANDRADE, S. F.; MATOS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Variação Sazonal de Metais Pesados em Siris *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863) da Lagoa de Iquipará, Brasil. **Rev. Virtual Quim.**, v.3, n.2, p.129-137, 2011.

AYRES, M.; AYRES-Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S.de. BIOSTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém, Pará, Brasil: Instituto Mamirauá, 2007.

BARRETO, A.V.; BATISTA-LEITE, L. de M. A; AGUIAR, M. C. A. Maturidade sexual das fêmeas de *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) nos estuários dos rios Botafogo e Carrapicho, Itamaracá, PE, Brasil. **Iheringia Sér. Zool.**, v.96, n.2, p.141-146, 2006.

BASTAMI, A. A.; KHOEI, J. K.; ESMAILIAN, M. Bioaccumulation of Heavy Metals in Sediment and Crab, *Portunus pelagicus* From Persian Gulf, Iran. **Middle-East J. Sci. Res.**, v.12, n. 6, p. 886-892, 2012.

BECHMANN, I.E.; STURUP, S.; KRISTENSEN, L.V. High resolution ISCP-MS determination and multivariate evaluation of 10 trace elements in mussels from sites in Limfjorden, Denmark. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v.368, n.7, p.708-714, 2001.

BODIN, N.; N'GOM-KÂ, R.; KÂ, S.; THIAW, O. T.; TITO DE MORAIS, L.; LE LOC'H, F.; ROZUEL-CHARTIER, E.; AUGER, D.; CHIFFOLEAU, J. F. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. **Chemosphere**, v. 90, p.150-157, 2013.

BOENING, D. W. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. **Environ. Monit. Assess.**, v. 55, n. 3, p. 459-470, 1999.

BOLDRINI, C.V. Mercúrio na Baixada Santista. In: SEMINÁRIO NACIONAL RISCOS E CONSEQUÊNCIAS DO USO DO MERCÚRIO, 1990, Rio de Janeiro. **Resumos**...Rio de Janeiro,1990, p.161-195.

BONA, I. A. T. ***Estudo de Assinaturas Químicas em Cerâmica da Tradição Tupiguarani da Região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil***. 2006.Tese (Doutorado) -Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BORDON, I. C. A. C; SARKIS, J. E. S.; GOBBATO, G. M.; HORTELLANI, M. A.; PEIXOTO, C. M. Metal concentration in sediments from the Santos Estuarine System: a recent assessment. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.22, n.10, p. 1858-1865, 2011.

BORDON, I. C. A. C; SARKIS, J. E. S.; TOMÁS, A.; SOUZA, M.; SCALCO, A.; LIMA, M., HORTELLANI, M. A. A Preliminary Assessment of Metal Bioaccumulation in the Blue Crab, *Callinectes danae* S., from the Sao Vicente Channel, Sao Paulo State, Brazil. **Bull. Environ.Contam. Toxicol.**, v.88, p.577–581, 2012.

BRAGA, E.; BONETTI,V.D.H.; BURONE,L.; BONETTI FILHO, J. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System-Brazil. **Mar. Pollut. Bull**, v.40, n. 2, p.165-173, 2000.

BRANCO, J. O.; AVILAR, M. G. Fecundidade em *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 9, n. 3-4, p. 167-173, 1992.

BRANCO, J. O.; VERANI, J. R. Dinâmica da alimentação natural de *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 14, n. 4, p. 1003-1018, 1997.

BRASIL. Decreto no 55.871, de 26 de março de 1965: Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DECRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: maio/2014.

BRASIL. Portaria SVS nº 685, de 27 de agosto de 1998: Aprova o Regulamento Técnico “Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos” e seu Anexo:“Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos” complementa e faz algumas modificações no Decreto Lei nº 55.871, de 26 de março de 1965. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=90>>. Acesso em: março/2011.

BRASIL. Resolução - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013:Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre “Limites Máximos de Contaminantes

Inorgânicos em Alimentos” e seu Anexo: “Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos” (Revogação das Res. GMC nº 102/94 e nº 35/96 e dos limites máximos de arsênio, cádmio, chumbo estanho e mercúrio que constam no Anexo da Portaria SVS nº 685, de 27 de agosto de 1998). Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: maio/2014.

BROUWER, M.; ENGEL, D. W. Stoichiometry and functional consequences of Hg(II) and Cd(II) binding to arthropodhemocyanins. In: VERNBERG, WW. B.; CALABRESE, A.; THURBERG, F. P.; VERNBERG, F. J. (Ed.). **Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity**. New York, N.Y.: Academic Press, 1982, p. 289-309.

BROUWER, M.; BROUWER-HAEXUM, T.; ENGEL, D. W. Cadmium accumulation by the blue crab, *Callinectes sapidus*: involvement of hemocyanin and characterization of cadmium-binding proteins. **Mar. Environ. Res.**, v.14, p. 71-88, 1984.

CASADO-MARTINEZ, M.C.; SMITH, B.D.; DELVALLS, T.A.; RAINBOW, P.S. 2008. Pathways of trace metal uptake in the lugworm *Arenicola marina*. **Aquat. Toxicol.**, v.92, n.1, p.9-17, 2008.

CATELANI, P.A. **Análise do impacto na lagoa de Mundaú (AL), através da determinação de metais pesados em siri azul (*Callinectes danae*, Smith 1869)**. 2009. (Trabalho de conclusão de curso)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro.

CCME- Canadian Council of Ministers of The Environment. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Canadian Environmental Quality Guidelines. 2001. Disponível em http://www.ccme.ca/assets/pdf/sedqg_summary_table.pdf. Acesso em Abril 2011.

CESAR, A.; CHOUERI, R. B.; RIBA, I.; MOVALES-CASELLES, C.; PEREIRA, C. D. S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D. M. S.; DEL VALLS, T. A. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system). **Environ. Int.**, v. 33, n. 4, p.429-435, 2007.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Estatísticas atualizadas até Março de 2011. 2011. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/estatisticas.pdf>. Acesso em 1º de maio de 2013.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Metais pesados na Baía de Santos e Estuários de Santos e São Vicente**. São Paulo: CETESB, 1981.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. ***Poluição das Águas no Estuário e Baía de Santos***. São Paulo: CETESB, 1979.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2012. Relatório Técnico CETESB. 189p. 2013. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes/-relatorios>. Acesso em: 1º de maio de 2013.

CHAFIK, A.; CHEGGOUR, M.; COSSA, D.; SIFEDDINE, S.B.M. 2001 Quality of Moroccan Atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. ***Aquat. Living Resour.***, v.14, n.4, p.239-249, 2001.

CHAPMAN, P. Effects of gut sediment contents on measurement of metal levels in benthic invertebrates- a cautionary note. ***Bull. Environ. Contam. Toxicol.***, v.35, p.345-347, 1985.

CHOU C. L.; HAYA, K.; PAON, L. A.; BURRIDGE, L.; MOFFATT, J. D. Aquaculture-related trace metals in sediments and lobsters and relevance to environmental monitoring program ratings for near-field effects. ***Mar Pollut. Bull.***, v. 44, p.1259-1268, 2002.

CNIO-Comissão Nacional Independente sobre os Oceanos –WORKSHOP REGIONAL SUL SOBRE O MAR: Repensando o Mar para o Século XXI, 2, 1998, Florianópolis. ***Anais ...*** Florianópolis:UFSC, 1998.

CODESP- Companhia de Docas do Estado de São Paulo. Mensário Estatístico 2010. Disponível em: <http://www.portodesantos.com.br/down/estatistica/estmen-2010-12.pdf>. Acesso em: 1º de março de 2011.

COELHO, J. P.; REIS, A.T.; VENTURA, S.; PEREIRA, M.E.; DUARTE, A.C.; PARDAL, M.A. Pattern and pathways for mercury lifespan bioaccumulation in *Carcinus maenas*. ***Mar. Poll. Bull.***, v. 56, p.1104–1110, 2008.

CONTI, M. E.; CECCHETTI, M. A biomonitoring study: trace metals in algae and mollusk from Tyrrhenian coastal areas. ***Environ. Res.***, v.93, p. 99-112, 2003.

CONTI, M.E. ***Biological Monitoring: Theory and Applications***. Massachusetts, U.S.A.: WIT Press, 2008.

COOK, JM; GARDNER, MJ; GRIFFITHS, AH; JESSEP, MA; RAVENSCROFT, JE; YATES, R. The comparability of sample digestion techniques for the determination of metals in sediments. ***Mar. Pollut. Bull.***, v. 34, n.8, p. 637-644, 1997.

COSIPA (USIMINAS)- Companhia Siderúrgica Paulista. A experiência da COSIPA e os ganhos ambientais com o tratamento e reuso das águas geradas em coquerias. 2008. Disponível em: http://www.fiesp.com.br/ambiente/produtos_servicos/downloads/merito%20ambiental/2008_cosipa.pdf. Acesso em: 1º de março de 2011.

COSTA, M.; PAIVA, E.; MOREIRA, I. Total Mercury in *Perna perna* mussels from Guanabara Bay-10 years later. **Sci. Total Environ.**, v. 261, n. 1-3, p. 69-73, 2000.

COSTA, T.M.; NEGREIROS-FRANSOZO, M.L. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba region, Brazil. **Crustaceana**, v.71, n. 6, p. 615-627, 1998.

COX, M.E.; PREDA, M. Trace metal distribution and relation to marine sediment mineralogy, Gulf of Carpentaria, Northern Australia. **Mar. Pollut. Bull.**, v.46, p.1622–1629, 2003.

CURTIUS, A.J.; SEIBERT, E.L.; FIEDLER, H.D. Avaliando a contaminação por elementos traços em atividades de maricultura. Resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Quím. Nova**, v. 26, n.1, p.44-52, 2003.

DARMONO, D.; DENTON, G. Heavy metal concentrations in the banana prawn, *Penaeus merguensis* and leader prawn, *P.monodon*, in the Townsville region of Australia. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 44, p.479-486, 1990.

DAVIES, I.; TOPPING, G.; GRAHAM, W.; FALCONER, F.; MCINTOSH, A.; SAWARD, D. Field and experimental studies on cadmium in the edible crab *Cancer pagurus*. **Mar. Biol.**, v.64, p.291-297, 1981.

DEPLEDGE, M. H. Re-evaluation of Metabolic Requirements for Copper and Zinc in Decapod Crustaceans. **Mar. Environ. Res.**, v. 27, p.115-126, 1989.

ELUMALAI, M.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. **Chemosphere**, v.66, p.1249–1255, 2007.

ENGEL, D. W. Metal Regulation and Molting in the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: Copper, Zinc, and Metallothionein. **Biol. Bull.**, v.172, n.1, p. 69-82, 1987.

ENGEL, D. W.; BROUWER, M. Trace metal binding proteins in marine mollusks and crustaceans. **Mar. Environ. Res.**, v.13, p.177–194, 1984.

EUROPEAN UNION. Commission regulation (E.C.) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **O. J. E.U.**, n.364, p. 5-24, 2006.

FORTSTNER, V., WITTMANN, G.T.W. **Metal pollution in the aquatic environment**. Berlin: Springer-Verlag, 1983.

FUKUMOTO, M. **Determinação da história deposicional recente do Alto Estuário Santista, com base nos teores de metais e na suscetibilidade magnética dos sedimentos**. 2007. Tese (Doutorado)-Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FURIA, R.R; SANTOS, M. C. F.; BOTELHO, E.R.O.; SILVA, C.G.M.; ALMEIDA, L. Biologia pesqueira do siri-açu *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea: Portunidae) capturado nos manguezais do município de Caravelas (Bahia – Brasil). **Bol. Téc. Cient. CEPENE**, v. 16, n. 1, p.75-84, 2008.

GOLDBURG, R.J.; ELLIOTT, M.S.; NAYLOR, R.L. In: Marine Aquaculture in the United States: Environmental Impacts and POLICY Options. PEW Oceans Commission: Arlington, Virgíia, 2001. Disponível em http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsoorg/Reports/Protecting_ocean_life/env_pew_oceans_aquaculture.pdf. Acesso em 1º de maio de 2012.

GOSAVI, K.; SAMMUT, J.; GIFFORD, S.; JANKOWSKI, J. Macroalgal biomonitoring of trace metal contamination in acid sulfate soil aquaculture ponds. **Sci.Total Environ.**, v.324, p.25-39, 2004.

HARARI, J., CAMARGO, R. Modelagem numérica da região costeira de Santos (SP): Circulação de maré. **Rev. Bras. Oceanogr.**, v.46, n.2, p.135-156, 1998.

HARRIS, R. R., SANTOS, M. C. F. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). **Mar. Biol.**, v.137, n. 4, p. 691-703, 2000.

HAYA, K.; WAIWOOD, B.A.; JOHNSTON, D.W. Adenylate energy charge and ATPase activity of lobster (*Homarus americanus*) during sublethal exposure to zinc. **Aquat. Toxicol.**, v.3, p.115-126, 1983.

HICKMAN Jr., C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**. 2nd Ed., Connecticut, U.S.A.: Appleton & Lange, 1994. p.75-111.

HOPKIN, S.; NOTT, J. Some observations on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the Shore Crab *Carcinus maenas* L. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, v. 59, p.867-877, 1979.

HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S.; BONETTI, J.; BONETTI, C. Evaluation of mercury contamination in sediments from Santos - São Vicente Estuarine System, São Paulo State, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, n.6A, p. 1140-1149, 2005.

HORTELLANI, M.A; SARKIS, J. E. S.; ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E.C. P. M. Avaliação Da Contaminação Por Elementos Metálicos Dos Sedimentos Do Estuário Santos – São Vicente. **Quím. Nova**, v. 31, n. 1, p.10-19, 2008.

HOSSEINI, M.; BASTAMI, A.A.; KHOEI, J.K.; ESMAILIAN, M.; SONGHORI, E.J.; NAJAFZADEH, M. Concentrations of Heavy Metals in Selected Tissues of Blue Swimming Crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) and Sediments from Persian Gulf. **World Appl. Sci. J.**, v.19, n. 10, p.1398-1405, 2012.

INMETRO -Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008**. INMETRO, 2011.

JENNINGS, J.; RAINBOW, P. Studies on the uptake of cadmium by the Crab *Carcinus maenas* in the laboratory. I. Accumulation from seawater and a food source. **Mar. Biol.**, v. 50, p.131-139,1979.

JOBLING, M. **Environmental Biology of Fishes**. 1st Ed. London, UK: Chapman & Hall, 1995, p. 415-422.

JOP, K. M., BIEVER, R. C., HOBERG, J.R., SHEPHERD, S.P. Analysis of Metals in Blue Crabs, *Callinectes sapidus*, from Two Connecticut Estuaries. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.58, p.311–317, 1997.

KEHRIG, H.D.A.; COSTA,M.;MOREIRA,I.;MALIM, O. Methylmercury and total Mercury in estuarine organisms from Rio de Janeiro, Brazil. **Environ. Sci. Pollut. Res.**,v. 8, n. 4, p.275-279, 2001.

KENNISH, M.J.**Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. London: CRC Press, 1991.

KHOEI, J.K.; BASTAMI, A.A.Mercury Concentrations in Tissues of Blue Swimming Crab *Portunus pelagicus* and Sediments from Khark Island. **World Appl. Sci. J.**, v. 21, n. 9, p. 1391-1397, 2013.

LAMPARELLI, M.L.; COSTA, M.P.; PRÓSPERI, V.A.; BEVILÁCQUA, J.E.; ARAÚJO, R.P.A.; EYSINK, G.G.L.; POMPEIA, S. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. São Paulo: CETESB, 2001.

LANDRY, C. C.;TOPHAM, R. W. Purification and characterization of an iron-binding protein from the blue crab *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.**, v. 97, n.4, p. 831-836, 1990.

LIMA, A.P.S.; SARKIS, J.E.S.; SHIHOMATSU, H.M.; MULLER, R.C.S.Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil.**Environ. Res.**, v. 97, p. 236-244, 2005.

LUIZ- SILVA, W.; MACHADO, W. Diluição geoquímica entre contaminantes sedimentares do estuário do Rio Morráo. **Geo. Brasiliensis** , v.26, n. 1, p. 39-48, 2012a.

LUIZ-SILVA, W.; MACHADO, W.; MATOS, R.H.R. Multi-Elemental Contamination and Historic Record in Sediments from the Santos-Cubatão Estuarine System, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.19, n.8, p. 1490-1500, 2008.

LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R.; KRISTOSCH, G.C.; MACHADO, W.Variabilidade espacial e sazonal da concentração de elementos-traço em sedimentos do Sistema Estuarino de Santos-Cubatão (SP). **Quím. Nova**, v.29, p.256–263, 2006.

LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R.; MACHADO, W.; NIZOLI, E.C. Taxas de sedimentação em Estuário do Sudeste do Brasil, baseadas em assinatura geoquímica e histórico industrial. **Geociências**, v. 1, p. 69-78, 2012b.

MAIA, C. B.; ALMEIDA, A.C.M.; MOREIRA, F.R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. **J. Braz. Soc. Ecotox.**, v.1, n.2, p.195-198, 2006.

MANTELATTO, F. L. M.; CHRISTOFOLETTI, R. A. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex, size and molt stage. **Mar. Biol.**, v. 138, n. 3, p. 585-594, 2001.

MARTINS, C.M.G. **Concentração de Metalotioneínas no Siri-Azul *Callinectes sapidus*: Efeito da Salinidade e da Composição Iônica da Água**. 2006. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MCPHERSON, R.; BROWN, K. The bioaccumulation of cadmium by the Blue Swimmer Crab *Portunus pelagicus* L. **Sci. Total Environ.**, v.279, p. 223-230, 2001.

MELO, G.A.S. **Manual de Identificação dos *Brachyura* (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. Sao Paulo, Brazil :Ed Plêiade, FAPESP, 1996.

NASH, W. W.; POOR, B. W.; JENKINS, K. 1981. The uptake and subcellular distribution of lead in developing sea urchin embryos. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.69C, p.205–21, 1981.

ONG CHE, R. G.; CHEUNG, S. G. Heavy metals in *Metapenaeus ensis*, *Eriocheir sinensis* and sediment from the Mai Po marshes, Hong Kong. **Sci. Total Environ.**, v. 214, n. 1, p. 87-97, 1998.

OSTAPCZUC, P.; BUROW, M.; MAY, K.; MOHL, C.; FRONING, M.; SÜBENBACH, B.; WAIDMANN, E.; EMONS, H. Mussel and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. **Chemosphere**, v. 34, n.9-10, p.2049-2058, 1997.

PAÉZ-OSUNA, F.; RUIZ-FERNANDEZ, C. Trace metals in the mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. **Environ. Pollut.**, v.87, p.243-247, 1995.

PAÉZ-OSUNA, F.; TRON-MAYEN, L. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vanamei* from the North-West Coast of Mexico. **Environ. Int.**, v.22, n.4, p.443-450, 1996.

PEREIRA, E.; ABREU, S.N.; COELHO, J.P.; LOPES, C.B.; PARDAL, M.A.; VALE, C.; DUARTE, A.C. Seasonal Fluctuations of Tissue Mercury Contents in the

European Shore Crab *Carcinus maenas* from Low and High Contamination Areas (Ria de Aveiro, Portugal). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 52, p. 1450–1457, 2006.

PFEIFFER, W.C.; FISZMAN, M.; LACERDA, L.D. Heavy metal surveys in Brazilian coastal environments. In: SELINGER, U.; LACERDA, L.D.; PACHINEELAM, S.R. (Ed). **Metals in Coastal Environments of Latin America**. Berlin: Springer Verlag, 1988, p. 3-8.

PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D.; FISZMAN, M.; LIMA, N.R. Metais pesados no pescado da Baía de Sepetiba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cien. Cult**, v. 37, p. 297-302, 1985.

PRÓSPERI, V.; EYSINK, G.G.J.; SAITO, L.M. **Avaliação do grau de contaminação do sedimento ao longo do canal de navegação do porto de Santos**. São Paulo: CETESB, 1998.

PRÓSPERI, V.A.; NASCIMENTO, I.A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 269-292.

QUINÁGLIA, G. **Caracterização dos Níveis Basais de Concentração de Metais nos sedimentos do Sistema Estuarino da Baixada Santista**. 2006. Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAINBOW, P. The significance of trace metal concentrations in decapods. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v. 59, p. 291-313, 1988.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environ. Pollut.**, v. 120, p. 497–507, 2002.

REICHMUTH, J. M.; ROUDEZ, R.; GLOVER, T.; WEIS, J. S. Differences in prey capture behavior in populations of blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) from contaminated and clean estuaries in New Jersey. **Estuar. Coast.**, v. 32, p. 298–308, 2009.

REICHMUTH, J.M., WEIS, P., WEIS, J.S. Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. **Environ. Pollut.**, v. 158, p. 361–368, 2010.

ROSSI, D.F. **Variação sazonal de metais pesados em siri azul (*Callinectes bocourti* A. Milne Edwards, 1879) na lagoa de Mundaú, Maceió (AL)**. 2009. (Trabalho de conclusão de curso)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

RUELAS-INZUNZA, J. R. ; PÁEZ-OSUNA, F. Distribution of Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in selected tissues of juvenile whales stranded in the SE Gulf of California (Mexico). **Environ. Int.**, v. 28, p. 325– 329, 2002.

RUELAS-INZUNZA, J. R.; PÁEZ-OSUNA, F.; SOTO, L. A. Bioaccumulation of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb and Zn in trophosome and vestimentum of the tube

worm *Riftia pachyptila* from Guaymas basin, Gulf of California. **Deep-Sea Res.Part**, v.I , n.52, p. 1319-1323, 2002.

SASTRE, M. P., REYES, P., RAMOS, H., ROMERO, R., RIVERA, J. Heavy Metal Bioaccumulation in Puerto Rican Blue Crabs (*Callinectes* spp). **Bull Mar Sci**, v.64, n.2, p.209–217, 1999.

SEMMLER, M.G.M.C. **Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**.2007. Tese (Doutorado)-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SERAFIM, C.F.S.; HAZIN, F.O. O ecossistema costeiro. In. CHAVES,P.T. **Geografia: o mar no espaço geográfico**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006, p.103

SEVERINO-RODRIGUES, E.; PITA, J. B., GRAÇA-LOPES, R. Pesca artesanal de siris (Crustacea, Portunidae) na região estuarina de Santos e São Vicente (SP), Brazil. **Bol. Inst. Pesca**, v. 27, n.1, p. 7–19, 2001.

SIQUEIRA, G.W. Estudo dos teores de metais pesados e outros elementos em sedimentos superficiais do Sistema Estuarino de Santos (Baixada Santista/São Paulo) e Plataforma Continental do Amazonas (Margem Continental Norte do Brasil). 2003. Tese (Doutorado)-Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIQUEIRA, G.W.; BRAGA, E.S.; LIMA, W.N.de; PEREIRA, S.F.P. Estudo granulométrico e de metais pesados (Pb, Zn e Cu) nos sedimentos de fundo do Sistema Estuarino de Santos/São Paulo-Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS AMBIENTAIS E SAÚDE, 4, **Anais...**, Santos/SP.2004a.v.1,p.1-6

SIQUEIRA, G.W.; BRAGA, E.S.; LIMA, W.N.de; PEREIRA, S.F.P.; SILVA, E. Distribuição do mercúrio em sedimentos de fundo no estuário de Santos-SP/Brasil. **Rev. Esc. Minas**, v.58, n.4, p. 309-316, 2005.

SIQUEIRA, G.W.; LIMA, W.N.de; MENDES, A.S.; APRILE, F.M.; BRAGA, E.S.; MAHIQUES, M.M. Evolução do impacto ambientais causado por matéria orgânica, mercúrio e arsênio nos sedimentos de fundo do sistema estuarino de Santos. **Geochim.**, v.18, n.1,p.54-63,2004b.

TOMMASI, L.R. **Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP)**. 1979. Tese (Livre-Docência)- Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

U.S.EPA. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. 2007.Disponível em <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>. Acesso em Abril, 2011.

U.S.EPA. Method 3052- Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices. 1996. Disponível em <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf>. Acesso em Outubro, 2011.

U.S.EPA. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal Mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver and Zinc). 2005. Disponível em http://www.epa.gov/nheerl/publications/files/metalsESB_022405.pdf. Acesso em Abril, 2011. v. 214, p. 87-97, 1998.

VAN LEEUWEN, C.J.; HERMENS, J.L.M. – **Risk assessment of chemicals: an introduction**. Dordrecht :Kluwer Academic Publishers, 1995, cap. 3.

VILLARES, R.; PUENTE, X.; CARBALLEIRA, A. *Ulva* and *Enteromorpha* as indicators of heavy metal pollution. **Hydrobiologia**, v.462, p. 221-232, 2001.

VIRGA, R. H. P., GERALDO, L.P. Investigação dos teores de metais pesados em espécies de siris azuis do gênero *Callinectes* sp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n.4, p. 943-948, 2008.

VIRGA, R.H.P. **Análise quantitativa de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) em siris azuis do gênero Callinectes sp. (Crustacea, Portunidae), provenientes do Rio Cubatão, Cubatão, São Paulo**. 2006. Dissertação (Mestrado)- Universidade Católica de Santos, Santos, São Paulo.

VIRGA, R.H.P., GERALDO, L.P., SANTOS, F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n. 4, p.787-792, 2007.

WAKASA, Y.S. **Contaminação mercurial em siris e carangueijos da Baía da Guanabara, Rio de Janeiro**. 2003. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis Ltd., 1996, cap. 4-5.

WENTWORTH, C.K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **J. Geol.**, v.30, p.377-392, 1922.

WILLIAMS, M.J. The swimming crabs of genus *Callinectes* (Decapoda:Portunidae). **Fish. Bull.**, v.72, p. 685-789, 1974.

YU, K. C.; TSAI, L. J.; CHEN, S. H.; HO, S. T. Correlation analyses on binding behavior of heavy metals with sediment matrices. **Water Res.**, v.35, n. 10, p.2417-2428, 2001.

YUSOF, A.M.; YANTA, N.F.; WOOD, A.K.H. The use of bivalves as bio-indicators in the assessment of marine pollution along a coastal area. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 259, n.1, p.119-127, 2004.

ZAR, J. H. ***Biostatistical Analysis***. 4th ed. New Jersey :Prentice-Hall, 1999.

ZBIKOWSKI, R.; SZEFER, P.; LATALA, A. Comparison of Green algae *Cladophora sp.* And *Enteromorpha sp.* as potential biomonitores of chemical elements in southern Baltic. ***Sci. Total Environ.***, v.387, p. 320 -332, 2007 .

10.APÊNDICES

APÊNDICE A: Dados biométricos por ponto de coleta e no geral; sexo e estágio de maturação dos siris coletados em agosto/2011.

SCN						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1	78,8	44,6	62,1	F	M	
2	76,8	42,7	49,8	M	I	
3	71,3	39,3	40,6	M	I	
4	62,0	36,6	24,3	M	I	
5	102,0	56,7	121,6	M	M	
6	69,2	38,4	39,5	F	M	
Média	76,7	43,1	56,3	x	x	
EP	5,6	3,0	14,0	x	x	
Max	102	56,7	121,6	x	x	
Min	62	36,6	24,3	x	x	
TGA						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1	87,1	52,5	87,3	M	M	
2	97,2	55,1	114,0	M	M	
3	84,4	51,3	69,4	M	M	
4	87,2	54,1	89,1	M	M	
5	91,1	53,9	100,4	M	M	
6	64,2	38,3	26,9	F	M	
Média	85,2	50,9	81,2	x	x	
EP	4,6	2,6	12,4	x	x	
Max	97,2	55,1	114,0	x	x	
Min	64,2	38,3	26,9	x	x	
PCI						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1	96,1	54,4	116,2	M	M	
2	83,1	46,5	73,1	M	M	
3	89,4	54,7	100,1	M	M	
4	88,3	52,4	95,9	M	M	
5	88,4	51,0	86,5	M	M	
6	86,8	51,6	84,8	M	M	
7	86,1	52,2	86,3	M	M	
8	104,6	62,3	129,4	M	M	
9	90,8	53,3	97,4	M	M	
10	90,1	54,2	93,6	M	M	
Média	90,4	53,3	96,3	x	x	
EP	1,9	1,3	5,1	x	x	
Max	104,6	62,3	129,4	x	x	
Min	83,1	46,5	73,1	x	x	
MOG						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1	92,7	54,9	111,8	M	M	
2	83,1	48,0	75,4	M	M	
3	88,1	50,8	88,0	M	M	
4	95,4	54,4	119,5	M	M	
5	83,6	48,9	79,5	M	M	
6	88,0	50,6	91,3	M	M	
7	78,2	45,9	57,5	M	M	
8	81,7	47,2	60,6	M	M	
9	74,0	44,1	51,9	M	M	
10	78,5	45,6	64,0	M	M	
Média	84,3	49	79,9	x	x	
EP	2,1	1,2	7,2	x	x	
Max	95,4	54,9	119,5	x	x	
Min	74	44,1	51,9	x	x	

QUI

Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1		81,9	47,2	71,3 M	M
2		77,2	44,7	56,3 M	M
3		76,4	44,6	58,6 M	M
4		85,9	50,0	81,1 M	M
5		84,8	48,8	55,5 M	M
6		80,6	47,3	67,8 M	M
7		90,6	51,6	95,7 M	M
8		85,9	50,0	82,5 M	M
9		88,4	50,8	89,0 M	M
10		64,8	38,1	29,7 M	I
Média		81,7	47,3	68,7 x	x
EP		2,4	1,3	6,2 x	x
Max		90,6	51,6	95,7 x	x
Min		64,8	38,1	29,7 x	x

COS

Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1		87,8	51,1	90,4 M	M
2		79,3	45,7	63,5 M	M
3		81,6	46,6	65,8 M	M
4		71,2	41,2	46,7 M	I
5		84,8	49,1	82,5 M	M
6		89,0	50,9	93,4 M	M
7		91,9	53,3	101,4 M	M
8		80,0	46,8	62,4 M	M
9		88,0	51,2	88,5 M	M
10		84,1	49,1	71,7 M	M
Média		83,8	48,5	76,6 x	x
EP		1,9	1,1	5,5 x	x
Max		91,9	53,3	101,4 x	x
Min		71,2	41,2	46,7 x	x

BRC

Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1		78,1	46,0	51,7 M	M
2		80,1	49,6	65,5 M	M
3		77,6	46,4	59,5 M	M
4		80,1	47,2	65,6 M	M
5		74,1	44,6	43,9 M	M
6		81,1	49,1	67,9 M	M
7		80,1	47,5	65,6 M	M
8		81,1	49,1	67,9 M	M
9		87,3	50,4	77,2 M	M
10		74,8	44,9	50,1 M	M
Média		79,4	47,5	61,5 x	x
EP		1,2	0,6	3,2 x	x
Max		87,3	50,4	77,2 x	x
Min		74,1	44,6	43,9 x	x

PIA

Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1		73,4	42,2	53,4 M	M
2		85,6	46,4	73,4 M	I
3		78,2	39,4	39,4 M	M
4		81,2	47,4	72,6 M	I
5		69,4	39,2	36,4 M	I
6		74,2	43,2	39,5 M	I
7		73,4	41,8	45,8 M	I
8		65,8	37,4	30,9 M	I
9		55,2	30,4	19,9 F	I
10		64,2	36,4	32,2 M	M
Média		72,1	40,4	44,4 x	x
EP		2,8	1,6	5,5 x	x
Max		85,6	47,4	73,4 x	x

Min	55,2	30,4	19,9	x	x
MAR					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	86,0	57,4	70,3	M	I
2	88,4	43,6	65,4	M	M
3	77,2	43,2	59,6	M	M
4	75,0	42,4	54,2	M	I
5	87,6	51,4	87,2	M	I
6	74,0	43,8	50,5	M	M
7	76,0	44,2	51,1	M	I
8	80,6	46,4	68,0	M	M
9	80,0	46,2	66,9	M	M
10	76,5	44,4	58,8	M	M
Média	80,1	46,3	63,2	x	x
EP	1,7	1,5	3,5	x	x
Max	88,4	57,4	87,2	x	x
Min	74	42,4	50,5	x	x
Dados gerais					
	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)		
Média	80,2	46,5	65,7		
EP	1,0	0,6	2,6		
Máximo	95,4	57,4	119,5		
Mínimo	55,2	30,4	19,9		

EP = Erro padrão; LC= Largura da carapaça; CC= Comprimento da Carapaça; EM= estágio de maturação

APÊNDICE B: Dados biométricos por ponto de coleta e no geral; sexo e estágio de maturação dos siris coletados em dezembro/2011.

SCN						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1		100,1	58,1	120,0 M		M
2		76,9	44,4	55,6 M		M
3		80,5	47,1	68,5 M		M
4		97,3	56,9	126,9 M		M
5		89,6	52,2	93,9 M		M
6		81,3	54,4	98,1 M		M
7		101,1	59,2	120,7 M		M
8		82,4	47,6	69,6 M		M
9		85,4	50,7	88,2 M		M
10		92,9	52,7	95,1 M		M
Média		88,8	52,3	93,6 x		x
EP		2,8	1,6	7,6 x		x
Max		101,1	59,2	126,9 x		x
Min		76,9	44,4	55,6 x		x
TGA						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1		80,8	47,4	66,1 M		M
2		77,1	46,2	52,4 F		D
3		89,1	51,3	86,5 M		M
4		87,2	50,9	84,4 M		M
5		71,1	42,1	42,4 M		I
6		65,8	38,9	33,6 M		I
Média		78,5	46,1	60,9 x		x
EP		3,7	2,0	8,9 x		x
Max		89,1	51,3	86,5 x		x
Min		65,8	38,9	33,6 x		x
PCI						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1		98,5	57,1	119,8 M		M
2		98,8	53,4	111,5 M		M
3		102,3	60,1	113,8 M		M
4		88,0	51,8	88,0 M		M
5		87,5	51,1	85,3 M		M
6		95,0	54,6	111,5 M		M
7		89,0	52,3	94,7 M		M
8		86,9	51,6	92,3 M		M
9		84,4	50,2	81,9 M		M
10		84,1	49,6	73,5 M		M
Média		91,5	53,2	97,2 x		x
EP		2,1	1,0	5,0 x		x
Max		102,3	60,1	119,8 x		x
Min		84,1	49,6	73,5 x		x
MOG						
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM	
1		87,6	50,1	87,6 M		M
2		80,6	47,2	59,0 M		M
3		97,0	55,3	100,3 M		M
4		81,8	48,2	71,2 M		M
5		92,3	54,3	102,5 M		M
6		87,3	50,4	84,7 M		M
7		86,6	49,5	77,0 M		M
8		92,4	53,3	76,4 M		M
9		87,5	50,3	82,3 M		M
10		92,7	52,8	89,3 M		M
Média		88,6	51,1	83,0 x		x
EP		1,6	0,8	4,1 x		x
Max		97,0	55,3	102,5 x		x

Min	80,6	47,2	59,0	x	x
QUI					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	83,8	48,4	63,0	M	M
2	97,2	55,1	114,0	M	M
3	85,7	49,9	81,8	M	M
4	70,2	45,4	53,1	M	M
5	83,8	46,4	66,5	M	M
6	84,6	48,2	71,3	M	M
7	88,7	52,0	86,6	M	M
8	89,2	52,6	85,8	M	M
9	85,7	50,9	79,5	M	M
10	79,3	46,2	62,2	M	M
Média	84,8	49,5	76,4	x	x
EP	2,2	1,0	5,5	x	x
Max	97,2	55,1	114,0	x	x
Min	70,2	45,4	53,1	x	x
COS					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	86,8	50,0	79,5	M	M
2	96,7	55,8	119,4	M	M
3	79,5	46,0	64,3	M	M
4	89,3	52,5	90,7	M	M
5	83,6	48,2	63,9	M	M
6	86,3	50,4	77,6	M	M
7	80,7	47,0	63,7	M	M
8	92,7	53,2	94,9	M	M
9	90,5	51,9	90,4	M	M
10	99,0	56,8	108,5	M	M
Média	88,5	51,2	85,3	x	x
EP	2,0	1,1	6,1	x	x
Max	99,0	56,8	119,4	x	x
Min	79,5	46,0	63,7	x	x
BRC					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	82,6	48,4	66,0	M	M
2	72,0	42,6	46,0	M	M
3	68,8	40,4	33,0	F	D
4	79,8	46,7	58,0	M	M
5	89,6	53,2	85,0	M	M
6	89,4	52,6	88,0	M	M
7	78,0	45,4	58,0	M	M
8	70,2	42,2	42,0	M	M
9	64,6	37,8	32,0	M	M
10	78,2	45,9	59,0	M	M
Média	77,3	45,5	56,7	x	x
EP	2,7	1,6	6,1	x	x
Max	89,6	53,2	88,0	x	x
Min	64,6	37,8	32,0	x	x
PIA					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	79,8	46,1	55,3	M	M
2	75,8	43,5	53,8	M	M
3	74,1	43,1	54,3	M	M
4	76,5	45,3	55,9	M	M
5	73,6	42,6	51,2	M	M
6	72,4	41,8	41,2	M	M
7	73,9	43,1	43,2	F	D
8	71,6	41,9	45,0	M	M
9	85,3	49,5	82,6	M	M
10	82,1	47,8	71,4	M	M
Média	76,5	44,5	55,4	x	x
EP	1,4	0,8	4,1	x	x

Max	85,3	49,5	82,6	x	x
Min	71,6	41,8	41,2	x	x
MAR					
Nº	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)	SEXO	EM
1	74,1	42,9	47,4	M	M
2	72,2	41,1	41,6	M	I
3	62,7	36,7	27,9	M	I
4	74,4	43,6	53,4	M	M
5	72,4	41,8	43,7	M	I
6	53,9	31,9	17,1	M	I
7	49,6	29,0	14,0	M	I
8	49,9	29,4	15,3	F	I
9	55,2	32,6	20,7	F	I
10	91,6	52,5	85,6	M	M
Média	65,6	38,2	36,7	x	x
EP	4,3	2,4	7,1	x	x
Max	91,6	52,5	85,6	x	x
Min	49,6	29,0	14,0	x	x
Dados gerais					
	LC (mm)	CC (mm)	PESO(g)		
Média	82,4	48	72,2		
EP	1,2	0,7	2,9		
Máximo	102,3	60,1	126,9		
Mínimo	49,6	29,0	14,0		

EP = Erro padrão; LC= Largura da carapaça; CC= Comprimento da Carapaça; EM= estágio de maturação

APÊNDICE C: Parâmetros da análise discriminante das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto/2011 (a) e dezembro/2011 (b) na área 1 (canal de São Vicente).

agosto/ 2011 (a)			
Wilks' λ :0,001	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	49,08	6,62	1,54
Variância acumulada	0,86	0,97	1,00
X ²	625,8*	269,7*	84,9*
Graus de liberdade	30	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Co	0,94	-0,03	-0,02
Fe	-0,75	-0,83	0,42
Zn	-0,50	0,97	0,32
Cd	0,52	0,25	0,84
Cu	-0,14	-0,63	-0,04
Pb	-0,13	-0,56	-0,58
Hg	0,07	-0,14	-0,53
Mn	0,23	0,16	-0,10
Cr	0,16	-0,28	0,21
Al	-0,09	0,57	-0,09
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	-2,43	-3,66	-0,28
Hepatopâncreas	-1,43	1,27	1,71
Músculos	-2,62	2,42	-1,34
Sedimento	21,64	-0,10	-0,27
dezembro/ 2011 (b)			
Wilks' λ :0,0004	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	77,76	11,73	1,76
Variância acumulada	0,85	0,98	1,00
X ²	721,3*	324,0*	92,5*
Graus de liberdade	30	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Co	1,09	-0,04	-0,10
Fe	-0,09	0,79	0,42
Zn	-0,69	-1,09	0,40
Cu	-0,01	0,39	0,58
Cr	-0,08	0,19	0,83
Al	-0,20	0,04	-0,45
Ni	0,92	0,01	0,58
Pb	-0,84	0,28	-0,92
Mn	0,30	0,24	-0,11
Hg	0,19	-0,15	-0,12
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	-1,83	4,77	-0,62
Hepatopâncreas	-3,75	-0,95	1,85
Músculos	-2,57	-3,65	-1,31
Sedimento	27,21	-0,52	0,29

*Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

APÊNDICE D: Parâmetros da análise discriminante das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto/2011 (a) e dezembro/2011 (b) na área 2 (região próxima ao polo de Cubatão).

agosto/ 2011 (a)			
Wilks' λ :0,001	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	393,68	5,94	3,29
Variância acumulada	0,98	0,99	1,00
X ²	853,1*	309,1*	132,7*
Graus de liberdade	30	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Cr	-1,58	-0,14	-0,08
Fe	0,55	0,54	-0,14
Zn	-0,30	-1,07	-1,05
Pb	0,82	0,16	2,11
Ni	-0,29	0,37	-0,39
Cd	0,64	0,30	-0,96
Cu	0,17	0,41	-0,24
Mn	-0,17	0,43	-0,44
Al	0,01	-0,11	0,36
Hg	-0,15	-0,19	0,27
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	7,84	2,96	1,37
Hepatopâncreas	5,55	0,07	-2,64
Músculos	4,99	-3,16	1,23
Sedimento	-61,35	0,42	0,12
dezembro/ 2011 (b)			
Wilks' λ :0,0001	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	269,47	10,39	1,00
Variância acumulada	0,95	0,99	1,00
X ²	790,1*	280,5*	59,1*
Graus de liberdade	30	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Co	-1,06	0,23	0,19
Fe	0,17	0,79	-0,02
Zn	-0,31	-0,44	-0,58
Cu	0,39	0,43	-0,12
Hg	-0,20	-0,76	0,85
Cd	0,70	0,55	-0,60
Pb	-0,47	0,12	0,52
Mn	0,02	0,30	-0,39
Cr	-0,04	-0,22	-0,71
Al	0,28	0,03	0,46
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	6,95	4,02	0,65
Hepatopâncreas	4,68	-0,22	-1,39
Músculos	3,56	-4,05	0,72
Sedimento	-50,67	0,82	0,04

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

APÊNDICE E: Parâmetros da análise discriminante das amostras de siris e de sedimento coletadas em agosto/2011 (a) e dezembro/2011 (b) na área 3 (canal de Santos).

agosto/ 2011 (a)			
Wilks' λ :0,001	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	60,72	6,52	1,55
Variância acumulada	0,88	0,97	1,00
X ²	470,6*	196,5*	62,3*
Graus de liberdade	33	20	9
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Co	0,87	0,32	0,32
Zn	-0,51	-0,83	-0,46
Cu	-0,29	0,80	-0,14
Al	-0,19	0,33	0,44
Cr	0,27	-0,38	0,54
Mn	0,28	0,53	-0,48
Fe	-0,59	0,05	-0,16
Ni	-0,09	0,03	-0,89
Pb	0,45	-0,002	0,21
Hg	-0,20	-0,10	0,38
Cd	0,16	-0,30	-0,07
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	-2,87	3,53	0,59
Hepatopâncreas	-2,55	-0,70	-1,80
Músculos	-2,96	-2,83	1,18
Sedimento	20,52	-0,003	0,07
dezembro/ 2011 (b)			
Wilks' λ :0,00002	p<0,0000		
Funções discriminantes	I	II	III
Autovalor	971,63	15,98	1,53
Variância acumulada	0,98	0,99	1,00
X ²	840,6*	297,1*	73,3*
Graus de liberdade	30	18	8
Variáveis	Coeficientes padronizados da função discriminante		
Cd	-0,91	0,12	-0,07
Fe	0,01	0,92	-0,22
Zn	-0,04	-1,00	-0,29
Co	0,74	0,40	0,22
Cu	-0,10	0,54	-0,44
Mn	0,09	1,00	-0,51
Pb	0,002	-0,63	0,56
Al	-0,18	-0,16	0,82
Cr	0,27	-0,17	-0,70
Hg	-0,34	-0,15	0,18
Médias das variáveis canônicas			
Brânquias	-10,40	5,05	0,90
Hepatopâncreas	-10,27	-0,01	-1,80
Músculos	-10,33	-5,04	0,90
Sedimento	89,63	0,01	0,01

**Observou-se significância da função; ^{ns} Não significativo

11. ANEXOS

ANEXO A: Localização das indústrias e terminais na Baixada Santista em 1999 publicada no relatório da CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001).

ANEXO B: Caracterização das fontes de poluição industrial na Baixada Santista, publicada no relatório da CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001).

Indústria	Produção Principal	Fluoreto	Níquel	Cromo	Fluoreto	Fenóis	Solventes Aromáticos	Solventes Halogenados	Organoclorados Aromáticos	Pesticidas Organoclorados	Carbamatos	Amônio	Cádmio	Chumbo	Cobre	Metais pesados				
																Cromo Total + Cr ⁶⁺	Manganês	Mercurio	Níquel	Zinco
Alba ⁽¹⁾	Resinas, formol		A			D										D				
Carbocloro	Cloro, soda, EDC					D	B									D	D	D		
CBE	Estireno	E				D	A								E	D	E	D		
Cia. Santista de Papel	Papel					D							D	D	D	D	D	D	D	D
CIEL	Coque verde (beneficiamento)															*	*	*		
Columbia	Negro de fumo																			
Copebrás	Ácido fosfórico, fertilizantes(P)	D	A		D											E	E	E		
Cosipa	Aços		D	D	D	D	B					B	E	E	D	A	D	E	D	D
Dow Química	Latex, polióis, poliestireno		D	E	D	B	A	A				E	D	D	D	E	D	D	D	D
IFC	Fertilizantes (mistura)	A	A		B															
Liquid Química	Ácido benzóico		D			D	A										A	D		
Manah ⁽²⁾	Fertilizantes (P)	D	D		D															
Petrobrás / RPBC	Derivados de petróleo		D	D	A	D	A						E	A	D	D	D	D	D	D
Petrocoque	Coque verde (beneficiamento)	E				D						E				E	D	D	D	D
Rhodia - Agro ⁽¹⁾	Pesticidas carbamatos									A										
Rhodia - UQC ⁽¹⁾	Organoclorados					D	B	B	B											
Serrana	Fertilizantes (N, P)	A	A		B															
Solorrico	Fertilizantes (N, P)	D	D		D								D							
Ultrafertil - CB	Fertilizantes (N)	D	D		D	D						E		D	E	E	E		D	D
Ultrafertil - PG	Fertilizantes (N, P)	D	D		D															
Union Carbide	Polietileno				D	B					D						A			D

(1) Indústrias paralizadas

(2) Indústrias com circuito fechado dos efluentes líquidos

* Contaminante presente na matéria prima / produto

Crterios de classificação

A - O poluente constitui matéria prima, produto ou insumo do processo produtivo

B - O poluente é resíduo (líquido ou sólido) obrigatório do processo produtivo

D - O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes (mesmo dentro dos padrões legais) - entre 1979 e 1999.

E - O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes cujo resultados apresentaram valores menor que (<)

ANEXO C: Caracterização das fontes de poluição nos terminais portuários da Baixada Santista, publicada no relatório da CETESB de 2001 (Lamparelli et al., 2001).

Empresa	Fluoreto	Nítrógeno	Enxofre	Cloro	Fluoreto	Sulfeto	Solventes Aromáticos (STX)	Solventes Halogenados	Fenóis	Metais Pesados									
										Cádmio	Chumbo	Cobalto	Cromo Total + Cr ⁶⁺	Manganês	Molibdênio	Níquel	Zinco		
Brasterminalis		D		E	D	E	A	A	D	E	E	D	E	D	E		D		
Dibal		D		D	D	D	A	A	D	E	E	D	D	D	D		D		
Granel Química		D		E	D	D	A	A	D	E	E	E	E	D	E	E	D		
Hamilton Fox ⁽¹⁾							A												
Maia ⁽²⁾		D		E	D	D	D	E	D	D	D	E	D	D	E	D	D		
Mobil		D		E	D	E	A	E	D	E	E	E	D	D	E	E	D		
Petrobras/DTCS - Alemoa		D		E	D	E	A		D	E	D	E	E	D	E		D		
Petrobras/DTCS - Cubatão		D		D			A		D		D								
Stolthaven		D		E	D	D	A	A	D	E	E	E	E	D	E		D		
Tefer			A			D													
Ultrafertil - Terminal Marítimo		A	A											D					
União	A	D		E	D	E	A	A	D	E	E	E	E	D	D		D		

(1) Terminal de grãos líquidos paralisados

(2) Empresa de lavagem de isoccontainers

Crêterios de classificação

A - O poluente constitui matéria prima, produto ou insumo manipulado ou armazenado

D - O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes (mesmo dentro dos padrões legais)

E - O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes cujo resultados apresentaram valores menor que (<) entre 1979 e 1998