

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA



**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM
BILES DE PEIXES COMO BIOMARCADOR NA BAÍA DE
GUANABARA**

Tese de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em ciências (Área de Saúde Pública)

MARINA MOREIRA FREIRE

Rio de Janeiro
2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública

Programa de Pós-graduação em Saúde Pública

**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM
BILES DE PEIXES COMO BIOMARCADOR NA BAÍA DE
GUANABARA**

MARINA MOREIRA FREIRE

Orientador: Dra Ana Rosa Linde Arias

Co-orientador: Anabela Sousa de Oliveira

EXAMINADORES

Dra. Ana Rosa Linde Arias
CESTEH-FIOCRUZ
(Presidente da Banca)

Dr. Josino Costa Moreira
CESTEH-FIOCRUZ

Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria
Professor Titular IBRAG-UERJ

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

F866d Freire, Marina Moreira
Determinação de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em biles de peixes como biomarcador na Baía de Guanabara. / Marina Moreira Freire. Rio de Janeiro: s.n., 2008.
xvii, 85 p., il., tab., graf.

Orientador: Linde-Arias, Ana Rosa
Oliveira, Anabela Sousa

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

1. Marcadores Biológicos. 2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. 3. Ecossistema. 4. Ambiente Aquático. 5. Peixes. 6. Poluição Ambiental. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.73

A Deus por ter me dado forças
novamente para lutar.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ana Rosa Linde Arias por ter confiado em mim e me dado este trabalho tão desafiador.

À minha co-orientadora Anabela Sousa de Oliveira que me iniciou no mundo da fluorescência sempre com muita paciência e carinho.

Aos meus pais por todo o apoio que sempre me deram.

À minha irmã, Imara, e à minha sobrinha, Helena, que ainda nem chegou, mas que já traz muita alegria pra minha vida.

Às minhas amigas do Laboratório, Vanessa e Ione, que dividiram a bancada por horas comigo e com os peixes.

Ao Armando e a Juju, por me ajudarem tanto nas análises estatísticas.

À Carla que embora não esteja mais lá me acompanhou com muita amizade no início desta jornada.

À Laura, minha vizinha querida, que sempre esteve presente, aparecendo de surpresa com algum mimo quando sentia que eu já não podia mais.

À Lu, minha amiga linda, sempre.

Ao Chico, pelo apoio que não pode, ou pelo menos eu não consigo, descrever com palavras.

À Cássia por estar sempre presente nos momentos mais difíceis pra mim e se esforçar muito pra que eles se tornem mais amenos.

Ao meu gato Cotozinho por ser meu grande companheiro nestes últimos tempos.

“Andando eu no meio da angústia, tu me revivificarás”
Salmo 138. 7

ABREVIATURAS

BG – Baía de Guanabara

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

BPM – Baixo peso molecular

APM – Alto peso molecular

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água

K – Fator de Condição

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

$\Delta\lambda$ – Delta lambda

FF – Fluorescência de comprimento de onda fixo

SFS – Espectrometria de Fluorescência Sincronizada

HPLC – F – Cromatografia líquida de alta performance com detector de fluorescência

u.a – Unidades arbitrárias

EP – Erro padrão da média

CV – Coeficiente de variação

RESUMO

A Baía de Guanabara (BG), segunda maior baía do litoral brasileiro possui extensão que engloba praticamente toda a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Esta baía se destaca por ser um estuário, sendo, desta forma, um ambiente particularmente fértil que abriga uma imensa variedade de formas marinhas que se alimentam, crescem e se reproduzem neste local. Entretanto, esta Baía, é um ecossistema eutrofizado e sujeito a contaminação química de diversas origens, como por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) oriundos principalmente das atividades petrolíferas intensas existentes nesta Baía. Estes compostos têm potencial mutagênico e genotóxico, além de representar uma ameaça ao ecossistema aquático como um todo em exposições prolongadas. Desta forma, a utilização de biomarcadores em peixes tem se mostrado bastante eficaz na avaliação dos efeitos da contaminação por esta classe de compostos. Diante disso, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o potencial do uso de metabólitos de HPAs em biles de peixes como biomarcador da contaminação por esta classe de compostos. Para tanto, foram utilizadas duas espécies de peixes: *Chilomycterus spinosus spinosus* (Baiacu-de-espinho) e *Micropogonias Furnieri* (Corvina). Estas espécies foram coletadas na Baía de Guanabara e Itaipu (região controle). O método para esta avaliação baseou-se na fluorescência destes compostos. Nas biles dos peixes coletados foram analisados os metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno através do método de Fluorescência Fixa (FF) e o 1 – Hidroxipireno por Fluorescência Sincronizada (SFS). Além disso, foi avaliada a influência de parâmetros biológicos e biométricos, como sexo e comprimento dos peixes, na determinação destes metabólitos. Avaliou-se ainda o Fator de Condição para Baiacu e Corvina de ambas as regiões. Da mesma forma, pretendeu-se observar se havia alteração da variabilidade dos dados de determinação dos metabólitos através de sua normalização pelas proteínas biliares totais. A partir da determinação de HPAs em Corvina foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a Baía de Guanabara e Itaipu para os metabólitos de Pireno e Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxipireno. Na avaliação realizada em Baiacu observou-se diferença significativa entre BG e Itaipu apenas para os metabólitos de Naftaleno. Entretanto, após a normalização destes dados pelas proteínas biliares,

observou-se para Corvina, diferenças significativas para todos os metabólitos de HPA em estudo; para Baiacu não foi mais observada diferença significativa para as regiões estudadas. No que se refere aos parâmetros biológicos e biométricos, tanto o sexo quanto o comprimento, não mostraram ter influência sobre a determinação dos metabólitos de HPAs. Foi ainda observada diferença significativa entre BG e Itaipu, tanto para Baiacu como para Corvina, no que se refere à avaliação do Fator de Condição. De forma geral, observou-se que a determinação dos metabólitos de HPAs em biles de peixes pode ser uma ferramenta útil no monitoramento da contaminação ambiental por esta classe de contaminantes mostrando-se apropriada para este tipo de avaliação.

ABSTRACT

Guanabara Bay (GB), the second largest bay in the Brazilian Coast, encloses nearly all metropolitan region of Rio de Janeiro State. GB it is an estuary, being the habitat for reproduction and growth of many species, including fishes. It is a particularly fertile environment, which receives an enormous variety of marine species, which feed, grow and reproduce in that local. Simultaneously GB is an eutrophized ecosystem, subjected to chemical contamination from different origins, as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) that mainly originated from intensive petroleum related activities on the Bay. This compounds have mutagenic and genotoxic potential, and represent also a threat to the aquatic ecosystem as an all on long term exposure. In this way, the use of biomarkers in fishes has shown to be efficient on the evaluation of the effects of contamination by this class of compounds. In face of that, the principal objective of this study was to evaluate the potentiality of using PAHs metabolites from fish bile as biomarker of the contamination by this class of compounds. For that two fish species were used: *Chilomycterus spinosus spinosus* (Baiacu-de-espinho) e *Micropogonias Furnieri* (Corvina). Fish were sampled at GB and Itaipu as control region. The evaluation method is based on the fluorescence arising from PAHs and its metabolites. Fish bile were analyzed for metabolites originated from Naphthalene, Pyrene and Benzo(a)pyrene by Fixed Fluorescence (FF) and 1-Hydroxypyrene by Synchronous Fluorescence (SFS). Furthermore, the influence of biological and biometric parameters, as sex and length, on metabolites determination was also evaluated. Condition Factor for Baiacu and Corvina from both regions was also evaluated. In the same way, the evaluation of the change on the variability of the data from metabolites determination by total biliary protein normalization was pretended. From the determination of PAHs in Corvina, statistical difference was found between GB and Itaipu for Pyrene and Benzo(a)pyrene metabolites and also for 1-Hydroxypyrene. From the evaluation on Baiacu statistical significant differences between GB and Itaipu was only found for Naphthalene metabolites. After normalization of these data by biliary proteins, for Corvina significant statistical differences were found for all PAHs metabolites under study. Regarding biological and biometric parameters, both sex and length, did not show any influence on

metabolites determination. A significant statistical difference was observed from GB to Itaipu, both for Baiacu and Corvina, relative to Condition Factor. Generally, it was observed that metabolites determination on fish bile can be a useful tool on monitoring environmental contamination by this class of pollutants, furthermore showing to be adequate for this kind of monitoring.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Importância dos ambientes aquáticos	1
1.2 - Poluição dos ambientes marinhos	4
1.3 - Poluição dos ambientes aquáticos por HPAs	6
1.4 - Características gerais dos HPAs	7
1.4.1 - Propriedades físico – químicas dos HPAs	8
1.4.2 - Distribuição e degradação de HPAs nos ambientes aquáticos	9
1.4.3 - Metabolização e toxicidade dos HPAs	10
1.5 - Uso de biomarcadores na avaliação da contaminação por HPAs	13
1.6 - Espécies bioindicadoras para avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos por HPAs	15
1.6.1 - Corvina e Baiacu como espécies bioindicadoras da contaminação por HPAs	16
1.6.1.1 – <i>Micropogonias Furnieri</i> (Corvina)	17
1.6.1.2 - <i>Chilomycterus spinosus spinosus</i> (Baiacu de espinho)	18
1.7 - Metodologias de análises de HPAs em biles de peixes	19
1.7.1 - Noções elementares de Fluorescência	19
1.7.2 - Técnicas para avaliação de fluorescência de HPAs em bile de peixes	20
1.7.3 - Vantagens e Desvantagens do uso de Espectroscopia de Fluorescência (FF) e de Fluorescência Síncronizada (SFS) para avaliação de fluorescência de HPAs em bile de peixes	21
1.8 - Influência dos fatores biológicos na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles de peixes	22
1.9 - Considerações gerais sobre a relevância do estudo	22
2 – OBJETIVOS	23
2.1 - Objetivo geral	23
2.2 - Objetivos específicos	23
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 – Reagentes	25
3.2 – Materiais	25
3.3 – Equipamentos	26
3.4 - Amostragem e extração da bile	26
3.5 - Determinação do Fator de Condição (K)	29
3.6 - Escolha dos HPAs utilizados na avaliação da exposição de peixes	29
3.7 - Preparação dos padrões de HPAs	29
3.8 - Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão	30
3.9 - Curvas Padrão	31
3.10 - Efeitos de adição padrão	32
3.10.1 - Adição de padrão em biles	32
3.10.2 - Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda	32
3.11 - Preparação de biles para análise e determinação dos metabólitos de HPAs de Corvina e Baiacu	33
3.12 - Dosagem de proteínas totais e normalização do status alimentar	34
3.13 - Análises estatísticas	35

4 – RESULTADOS	36
4.1 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de HPAs	36
4.1.1 - Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão	36
4.1.2 - Curvas padrão	38
4.2 - Avaliação do efeito de adição padrão	41
4.2.1 - Adição de padrão em biles	41
4.2.2 - Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda	43
4.3 - Espectros das biles dos peixes por FF e SFS	45
4.4 - Parâmetros biométricos e biológicos dos peixes	46
4.5 - Biomarcadores utilizados na avaliação dos efeitos da contaminação por HPAs	48
4.5.1 - Fator de Condição (K)	48
4.5.2 - Análises dos metabólitos de HPAs	49
4.6 - Análise dos dados obtidos	52
4.6.1 - Análise da relação entre as concentrações dos metabólitos de HPAs biliares e parâmetros biológicos e biométricos	52
4.6.2 - Efeitos do status alimentar	54
4.6.3 - Avaliação da diferença entre BG e Itaipu em relação às concentrações dos metabólitos de HPAs biliares antes e após a normalização pela proteína	57
5 – DISCUSSÃO	62
5.1 - Considerações gerais sobre os aspectos analíticos utilizados para determinação de HPAs	63
5.1.1 - Determinação dos comprimentos de onda para determinação de HPAs	63
5.1.2 - Curvas padrão	64
5.1.3 - Avaliação do efeito de adição padrão	64
5.1.3.1 - Adição de padrão em biles	64
5.1.3.2 - Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda	65
5.2 - Considerações gerais sobre a determinação de HPAs em bile	66
5.3 - Análises biológicas e biométricas dos peixes e possíveis influências na determinação dos HPAs nas biles	67
5.4 - Efeitos da condição alimentar	68
5.5 - O uso de biomarcadores para avaliação dos efeitos da contaminação de HPAs em peixes	69
5.5.1 - Fator de condição (K)	69
5.5.2 - Determinação dos metabólitos de HPAs em bile de Corvina e Baiacu e normalização destes dados pela proteína biliar	70
5.6 - Escolha da espécie sentinela para avaliação da exposição a HPAs	71
6 – CONCLUSÃO	73
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de satélite da Baía de Guanabara e da zona costeira de Itaipu.	4
Figura 2 – Representação estrutural do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno.	7
Figura 3 – Principais processos de distribuição e degradação dos HPAs no meio aquático.	10
Figura 4 – Representação simplificada do metabolismo do Benzo(a)pireno.	11
Figura 5 – <i>Micropogonias Furnieri</i> (Corvina).	17
Figura 6 - <i>Chilomycterus spinosus spinosus</i> (Baiacu de espinho).	18
Figura 7 - Diagrama de Jablonski simplificado mostrando os níveis moleculares de energia e o processo de excitação e emissão.	19
Figura 8 – Imagens da Baía de Guanabara (A) e da Praia de Itaipu (B).	27
Figura 9 – Imagens das etapas de manipulação como pesagem, sexagem e retirada da bile de uma das espécies bioindicadoras.	28
Figura 10 – Espectros de excitação e emissão do Naftaleno; do Pireno; e do Benzo(a)pireno.	37
Figura 11 – Espectro de fluorescência sincronizada do 1 – Hidroxipireno, $\Delta\lambda=37$ nm.	38
Figura 12 – Espectros de emissão de Fluorescência Fixa (FF) das concentrações crescentes do padrão do Naftaleno; Pireno; Benzo(a)pireno.	39
Figura 13 – Espectros de fluorescência (SFS) de concentrações crescentes do padrão do 1-Hidroxipireno;	40
Figura 14 – Espectro de emissão de fluorescência de uma amostra aleatória de bile e das adições do padrão de Naftaleno; Pireno; Benzo(a)pireno; e 1-Hidroxipireno.	42
Figura 15A – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Naftaleno sobre bile.	43
Figura 15B – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Pireno sobre bile.	44
Figura 15C – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Benzo(a)pireno sobre bile.	44
Figura 15D – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Naftaleno sobre bile.	45

Figura 16 – Espectros de fluorescência de biles de Corvinas da Baía de Guanabara e Itaipu.	46
Figura 17 – Média do fator de condição com seu erro padrão (barras de erro sobre as colunas), para Baiacu e Corvina em ambas as regiões estudadas.	49
Figura 18 – Média da concentração dos metabólitos do Naftaleno analisados em Baiacu da BG e Itaipu.	58
Figura 19 – Média das concentrações dos metabólitos de Pireno, Benzo(a)pireno e do 1-Hidroxi-pireno analisados em Corvina da BG e Itaipu.	59
Figura 20A – Média da concentração dos metabólitos do Naftaleno analisados em Corvina da BG e Itaipu após normalização pela proteína.	60
Figura 20B – Média das concentrações dos metabólitos de Pireno, Benzo(a)pireno e do 1-Hidroxi-pireno analisados em Corvina da BG e Itaipu após normalização pela proteína.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno.	8
Tabela 2 – Equações da reta e coeficiente de correlação das curvas padrão dos quatro compostos em estudo.	40
Tabela 3 – Média do peso e comprimento com seu erro padrão, mínimo e máximo, de Baiacus e Corvinas coletados na BG e em Itaipu.	47
Tabela 4 – Número de Baiacus e Corvinas analisados por sexo e local de coleta.	48
Tabela 5 – Média com seu erro padrão (EP), máximo e mínimo da concentração dos metabólitos de HPAs de Baiacus e Corvinas da BG e Itaipu.	51
Tabela 6 – Diferença entre machos e fêmeas de Baiacus e Corvinas na determinação dos metabólitos de HPAs, na BG e em Itaipu.	53
Tabela 7 – Valores de correlação de Pearson (r^2) e significâncias estatísticas dos comprimentos e pesos de Baiacus e Corvinas e os metabólitos de HPAs.	54
Tabela 8 – Média com seu erro padrão (EP), máximo e mínimo da concentração dos metabólitos de HPAs de Baiacus e Corvinas da BG e Itaipu normalizados pela proteína biliar.	56
Tabela 9 – Coeficientes de Variação (CV) da concentração dos quatro tipos de metabólitos de HPAs em estudo, antes e após normalização pela proteína.	57

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Importância dos ambientes aquáticos

Os oceanos cobrem aproximadamente 71% da superfície do planeta, tendo papel dominante nos processos biogeoquímicos, quer em escala local, regional ou global ¹. Estes ecossistemas abrigam grande diversidade de seres, incluindo algas, bactérias, macrófitas, artrópodes (crustáceos e insetos) e vertebrados ². Em torno de 80% da produção de oxigênio da Terra é realizada por fitoplânctons provenientes dos ecossistemas marinhos. Ressalta-se, ainda, que 90% de toda a população marinha advêm de áreas costeiras, sobretudo das zonas tropical e subtropical. Essas áreas costeiras são essenciais à manutenção da biodiversidade, proporcionando locais de reprodução, desenvolvimento e crescimento para muitas espécies ¹.

A diversidade e produtividade dos ecossistemas marinhos são igualmente importantes para a sobrevivência e o bem-estar humano. Estes habitats fornecem fonte de alimento e de renda para as populações, muitas das quais vivem das atividades pesqueiras, o que torna a pesca um importante suporte econômico e social para várias regiões ³.

O Brasil é um país que apresenta ambientes marinhos complexos e únicos abrigando um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental. Ao longo do litoral brasileiro podem ser encontrados manguezais, restingas, dunas, praias, ilhas, costões rochosos, baías, brejos, falésias, estuários, recifes de corais, etc ⁴. Alguns destes ecossistemas são extremamente importantes do ponto de vista ecológico, econômico e social, como, por exemplo, os estuários. Estes ambientes são, por definição, corpos d'água formados quando a água doce oriunda dos rios se mistura com águas salgadas vindas do oceano. Esta mistura de água doce e salgada cria um ambiente único abundante em nutrientes, contribuindo para uma produtividade biológica extremamente alta ⁵. Os estuários são o habitat para a reprodução e desenvolvimento de diversas espécies, incluindo diversos peixes, os quais migram para os estuários durante seus períodos de reprodução ⁶.

O litoral sudeste brasileiro estende-se do Recôncavo Baiano até São Paulo. Além de possuir áreas características de falésias, recifes e praias de areias monazíticas (mineral de cor marrom-escura), este litoral é dominado pela Serra do Mar apresentando, desta forma, uma costa muito recortada, com várias baías e pequenas enseadas. No litoral do Estado Rio de Janeiro, por exemplo, são encontradas baías,

como a Baía de Sepetiba e de Ilha Grande dentre as quais, algumas possuem grande importância, como a Baía de Guanabara (BG) ⁴. Além disso, neste litoral há regiões de enseada, que formam áreas semi-abrigadas, porém com ampla comunicação com o mar, como o caso da região costeira de Itaipu em Niterói ⁷.

Dos 850 km de extensão litorânea do estado do Rio de Janeiro, 131 km correspondem ao perímetro da Baía de Guanabara ⁸ (figura 1). Esta é a segunda maior baía do litoral brasileiro ⁹ e localiza-se entre os meridianos 043°00' – 043°20' W e entre as latitudes 22°40' – 23°00' S ¹⁰. Tem extensão de 384 km² de área superficial total e 328 km² de espelho d'água ⁸, extensão esta que engloba praticamente toda a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro ⁹. Possui 1,9 x 10⁹ m³ de volume d'água médio, 4.080 km² de bacia de drenagem e 100 ± 60 m³ s⁻¹ de vazão hídrica, que é principalmente atribuída (ca. 75%) aos 35 rios que drenam em direção à baía e o restante (ca. 25%) à transposição de águas do rio Paraíba do Sul. A profundidade da baía não é uniforme. Ao longo do canal principal, que segue o eixo principal da baía, a profundidade média é de 20 m, enquanto que no extremo noroeste da baía a profundidade é em torno de 1 m durante a baixa-mar ⁸. O clima da Baía de Guanabara é típico de região estuarina: tropical úmido com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A temperatura de ar anual média é 23,7°C, e a umidade relativa anual média é 78% ao nível do mar. A Baía de Guanabara é caracterizada por possuir altas salinidades e temperaturas ¹¹.

Do ponto de vista das características naturais, a Baía da Guanabara apresenta-se como um estuário originado pelo afogamento marinho de uma complexa bacia fluvial, limitada por alinhamentos rochosos e condicionada por compartimentos estruturais. Em poucas palavras, é um conjunto de vales afogados e um estuário de origem tectônica, o que resulta em permanente e variável mistura de águas doces - provenientes das bacias fluviais contribuintes, e de águas salinas, que penetram em seu interior devido ao movimento oscilatório das marés. Essas condições naturais definem um ambiente particularmente fértil, do ponto de vista da produção primária, o que abrigou um conjunto diversificado de ecossistemas, desde a Mata Atlântica nas encostas até os manguezais que se estendem na margem da baía. O uso do solo no entorno da Baía da Guanabara é marcado pela forte antropização de suas características naturais originais. O conjunto de terras baixas e mal drenadas, limitadas pelos alinhamentos rochosos da Serra do Mar e do Maciço Carioca, foi um sítio privilegiado para o desenvolvimento da atividade humana desde os primórdios da colonização ¹².

Já a região costeira de Itaipu está localizada na orla oceânica do município de Niterói, Rio de Janeiro (22° 53'14"S, 43° 22'48"W). Sua linha de costa ocupa uma extensão de 4,5km e apresenta uma formação semicircular no sentido leste-oeste, sendo dividida na sua porção mediana pelo canal da lagoa de Itaipu. O perfil da praia é, na sua maior parte, íngreme e reflexivo, com profundidades entre 3 a 28m e uma cobertura sedimentar homogênea, constituída predominantemente por areia média com alguns pontos de depósitos arenosos mais finos provenientes do canal de Itaipu. A enseada é limitada em direção ao oceano pelo alinhamento das ilhas do Pai, da Mãe e da Menina¹³ (Figura 1).

Tanto a Baía de Guanabara como a região costeira de Itaipu são zonas que desempenham um importante papel de ligação entre ecossistemas terrestres e marinhos, possibilitando trocas genéticas e de biomassa, caracterizando-as como ambientes dinâmicos e biologicamente diversificados. As elevadas concentrações de nutrientes, a presença de gradientes termohalinos, o fornecimento de abrigo para reprodução e o suporte à alimentação inicial de um grande número de espécies, são alguns dos fatores que atraem para as zonas costeiras a atenção quanto à conservação de recursos naturais e a manutenção da biodiversidade. Muitas espécies marinhas utilizam diferentes habitats costeiros em fases distintas do seu desenvolvimento, completando assim os seus ciclos de vida. Por exemplo, várias espécies de peixe da família Sciaenidae utilizam habitats estuarinos quando juvenis e áreas marinhas adjacentes quando adultas⁷.

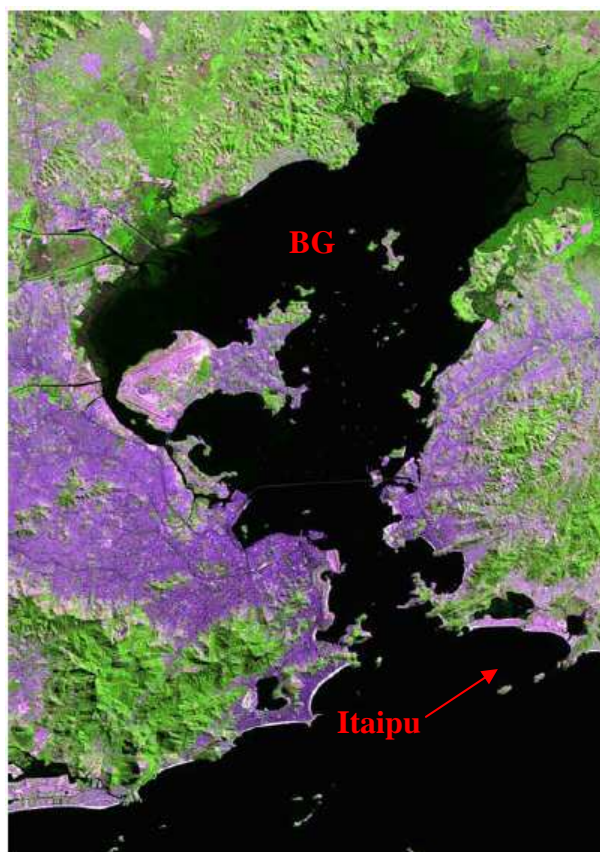


Figura 1 – Foto de satélite da Baía de Guanabara e da zona costeira de Itaipu ¹⁴.

1.2 – Poluição dos ambientes marinhos

A história da poluição ambiental aquática remonta o início da história da civilização humana. Entretanto, a poluição aquática não recebeu muita atenção até que fosse atingido um limite a partir do qual se pôde perceber conseqüências adversas nestes ecossistemas e em seus organismos. A partir daí, surge um interesse global em relação às questões referentes à poluição aquática, embora ainda haja muitos países produzindo cargas enormes de poluição com fortes tendências de aumento ¹⁵.

Com o crescimento exacerbado da industrialização e da urbanização ocorridos nestas últimas décadas, estes ecossistemas passaram a sofrer grandes impactos decorrentes destes processos. Atividades industriais, agrícolas e domésticas são responsáveis pelo uso de mais de um terço da água doce acessível, além disso, estas atividades são grandes responsáveis pela contaminação destas águas por numerosos compostos sintéticos. Estas águas contaminadas atingem os rios, lagos, nascentes e oceanos contendo uma infinidade de produtos químicos em diversas concentrações. Podemos somar a estas formas de contaminação das águas, os derramamentos de

petróleo e seus derivados, que representam outra importante fonte de poluição ¹⁶. Esta poluição é extremamente danosa aos ecossistemas aquáticos, uma vez que muitos dos poluentes que atingem estes ecossistemas são extremamente tóxicos para os organismos vivos ¹⁷. Além disso, outras atividades humanas, tais como pesca, a introdução de espécies exóticas e o crescimento desordenado no litoral vêm causando danos significativos a estes ecossistemas e são uma séria ameaça a biodiversidade marinha ³.

Em relação ao Brasil, podemos dizer que a intensidade do processo de ocupação desordenado vem colocando em risco todos os ecossistemas presentes na costa litorânea do país. A densidade demográfica média da zona costeira brasileira fica em torno de 87 hab./km², cinco vezes superior à média nacional que é de 17 hab./km². Pela densidade demográfica nota-se que a formação territorial foi estruturada a partir da costa, tendo o litoral como centro difusor de frentes povoadoras, ainda em movimento na atualidade. Hoje, metade da população brasileira reside numa faixa de até duzentos quilômetros do mar, o que equivale a um efetivo de mais de 70 milhões de habitantes, cuja forma de vida tem impacto direto nos ecossistemas litorâneos. Não há dúvida em definir as zonas costeiras do Brasil como as maiores fontes de contaminação do meio marinho no território brasileiro. Além do mais, as grandes cidades litorâneas abrigam um grande número de complexos industriais dos setores de maior impacto sobre o meio ambiente (petroquímica, química, celulose) ⁴. A região Sudeste é um exemplo claro deste modelo de organização urbana desordenado. Esta região possui a maior densidade demográfica e constitui o maior pólo econômico e industrial do país. Destaca-se o eixo Rio - São Paulo que, por sua localização na zona costeira, exerce influência direta como pressão desestabilizadora dos ecossistemas aquáticos. Associados a isso estão os portos (fontes reais e potenciais de poluição química), os terminais petrolíferos, as atividades de cultivo aquático (incluindo a introdução de espécies exóticas) e o aporte de águas fluviais contendo fertilizantes e agrotóxicos ¹⁸.

Alguns ecossistemas aquáticos da região Sudeste possuem características peculiares, o que os torna particularmente susceptíveis aos efeitos dos impactos antropogênicos. Como exemplo, pode-se citar o perfil de entorno dos estuários e das baías costeiras do Sudeste que é constituído de formações intrinsecamente frágeis. Devido ao seu complexo dinamismo e às suas conformações e dimensões, esses ambientes, quando alterados por distúrbios naturais ou antropogênicos, podem sofrer danos irreversíveis, comprometendo as importantes funções que realizam ¹⁸.

As baías do Estado do Rio de Janeiro são exemplos claros dos processos de poluição que vêm ocorrendo nas últimas décadas. A Baía de Guanabara pode ser citada como um ecossistema eutrofizado e sujeito à contaminação química de diversas origens, além da poluição gerada pela grande quantidade de esgoto doméstico não tratado despejado neste local ¹⁹. Dos 11 milhões de habitantes residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro, cerca de 7,8 milhões geram esgotos domésticos que são lançados diretamente nesta baía ¹¹. Além disso, outras fontes potenciais de poluição são os 14.000 estabelecimentos industriais, 14 terminais marítimos de carga e descarga de produtos oleosos, dois portos comerciais, diversos estaleiros, duas refinarias de petróleo, mais de mil postos de combustíveis e uma intrincada rede de transporte de matérias-primas, combustíveis e produtos industrializados permeando zonas urbanas altamente congestionadas ⁹. A maior parte das atividades petrolíferas do Rio de Janeiro está concentrada em torno da Baía de Guanabara, gerando como consequência para esta Baía, alta taxa de contaminação por hidrocarbonetos ²⁰. Além dos impactos diretos causados neste ecossistema aquático e em sua biota, a falta de qualidade ambiental da Baía vem também acarretando perda de qualidade de vida da população que vive em função de seus recursos naturais, e com isso, causando o prejuízo de suas atividades econômicas e sociais ²¹.

Já a região costeira de Itaipu é considerada uma área bem preservada, muito embora a intensa urbanização desta área junto ao turismo e condições sanitárias precárias deste sistema natural venha provocando modificações em seus atributos físicos, químicos e biológicos ²².

1.3 – Poluição dos ambientes aquáticos por HPAs

De forma geral, dentre as diversas fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos, em particular a Baía de Guanabara, pode-se dar destaque à contaminação destes ambientes por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), uma vez que estes compostos são encontrados de forma ubíqua como contaminantes nos diversos compartimentos ambientais (água, ar e solo) ²³ além de serem tóxicos aos organismos marinhos ²⁴.

As fontes de HPAs podem ser tanto naturais, como por exemplo, incêndios de florestas, vulcões, ou antropogênicas, como emissões por veículos, queima de carvão, processos industriais, como produção de alumínio e celulose, derramamentos de

petróleo entre outras ²⁵. De forma geral, as fontes naturais são responsáveis por uma menor contribuição do total de HPAs que atingem o meio ambiente ²⁶.

Os HPAs podem atingir os ecossistemas aquáticos de diversas formas, como por deposição atmosférica, carreamentos superficiais por escoamento de água de chuva, descargas de esgotos domésticos, efluentes industriais, derramamentos de petróleo, etc ²⁷. No meio ambiente, estes compostos normalmente são encontrados como misturas complexas de HPAs, pois raramente são liberados individualmente para os ambientes ²⁸.

1.4 – Características gerais dos HPAs

Os HPAs são uma vasta classe de compostos, com estrutura química semelhante, caracterizadas por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados ²⁵. Podem ter origem pirogênica (formados pela combustão de matéria orgânica, como combustíveis fósseis, em um curto período de tempo, a altas temperaturas e tipicamente baixa pressão); petrogênica (oriundos do petróleo, formados por processos geológicos a baixas temperaturas por longos períodos de tempo e possivelmente pressão elevada); diagênica (formados nos sedimentos por processos físicos, químicos e biológicos após a deposição de matéria orgânica); e biogênica (formado por animais, plantas, fungos e bactérias) ^{28,29}.

A figura 2 mostra a representação estrutural de três HPAs, dentre os quais temos o Naftaleno que têm origem petrogênica e o Pireno e Benzo(a)pireno que possuem origem pirogênica ³⁰.

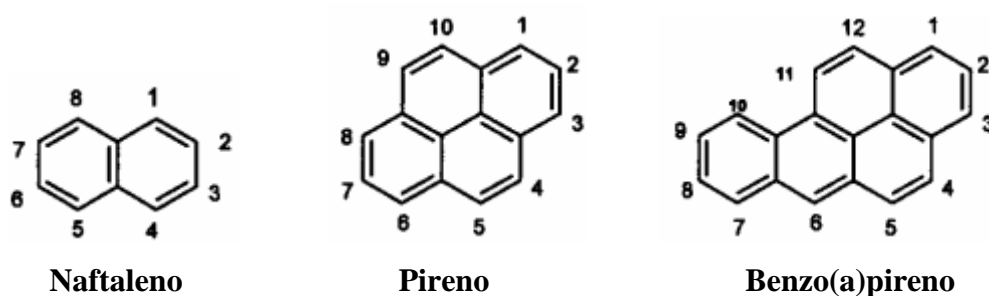


Figura 2 – Representação estrutural do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno.

1.4.1 – Propriedades físico – químicas dos HPAs

De forma geral, os HPAs são sólidos a temperatura ambiente e são pouco solúveis em água, com tendência de diminuição da solubilidade com aumento do número de anéis (massa molecular) ^{25, 31}.

Apesar de possuírem estruturas químicas similares suas propriedades físico-químicas são bastante variadas. Os HPAs que possuem até três anéis benzênicos são chamados de HPAs de baixo peso molecular (BPM), enquanto os que possuem mais de três são denominados HPAs de alto peso molecular (APM). Estes grupos gerais, BPM e APM, são úteis pois seus membros partilham características similares. De fato, as diferenças de peso molecular determinam, em grande parte, as propriedades físico-químicas dos HPAs ³².

Os HPAs de BPM possuem baixos pontos de ebulição e fusão e também baixos coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}), alguma solubilidade em água (o que os torna mais facilmente degradáveis), e maior pressão de vapor comparada aos HPAs de APM. No grupo dos HPAs de APM são encontrados compostos com alto ponto de ebulição e fusão, baixa solubilidade em água, maiores K_{ow} e alta toxicidade para plantas e animais ^{32, 33}.

É importante salientar que o coeficiente de partição octanol/água descreve a tendência de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa. Referindo-se à afinidade que um composto tem com a matéria orgânica. Desta forma, este parâmetro tem sido correlacionado com fatores de bioconcentração nos organismos vivos, já que simula a partição da substância entre a água e o tecido adiposo ^{34, 35}.

A tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas de alguns HPAs.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno.

nº de anéis benzênicos	HPA	Peso molecular (g/mol)	Pressão de vapor (Pa, 25° C)	Log Kow	Solubilidade em água (mg/L)	Tempo de meia-vida na água (h)
2	Naftaleno	128	36,4	3,37	31	170
4	Pireno	202	0,0119	5,18	0,132	1700
6	Benzo(a)pireno	252	2,13 x 10 ⁻⁵	6,04	0,0038	1700

Fonte: ^{25, 36}

1.4.2 – Distribuição e degradação de HPAs nos ambientes aquáticos

O destino e o transporte dos HPAs no ambiente é dependente, prioritariamente de sua hidrosolubilidade. Desta forma, o peso molecular do HPA, ou seja, o número de anéis aromáticos, pode ser considerado o parâmetro mais importante na distribuição destes compostos através dos sistemas hidrológicos ³¹. De forma geral, os HPAs possuem baixa hidrosolubilidade, entretanto, os mais solúveis são normalmente encontrados na coluna d'água, enquanto os de maior peso molecular tem tendência de aderir a partículas e ao sedimento podendo ser depositados no fundo dos corpos d'água ³².

A hidrofobicidade dos HPAs e sua conseqüente aderência ao sedimento contribuem de forma significativa para a persistência destes compostos no meio aquático e também nos tecidos adiposos de animais expostos ³². Os HPAs de até quatro anéis podem ser removidos da coluna d'água por volatilização para a atmosfera, ou através da ligação a partículas suspensas ou sedimento ou ainda pela captação destes compostos pela biota aquática ²⁷. Geralmente na coluna d'água a concentração de HPAs com mais de dois anéis aromáticos é bastante baixa enquanto a concentração de todos os HPAs nos sedimentos pode ser bastante elevada ³⁷.

Os principais processos que contribuem para degradação dos HPAs em água são a fotooxidação, oxidação química e biodegradação por organismos aquáticos. A hidrólise não é considerada um processo importante de degradação de HPAs. A contribuição individual de cada processo para o destino final dos HPAs dependerá de fatores como temperatura, profundidade e estado de poluição do corpo hídrico, fluxo de circulação da água e concentração de oxigênio. A taxa e extensão da fotodegradação variam amplamente entre os distintos HPAs. A importância da fotooxidação diminuirá sensivelmente com aumento da profundidade e turbidez do corpo d'água devido à atenuação e espalhamento da luz ²⁷.

De forma geral, a oxidação por oxigênio singlete e radicais peróxidos são os dois processos oxidativos mais importantes na degradação de HPAs em águas poluídas. Entretanto, estas reações não são consideradas importantes no controle da degradação global dos HPAs em água. Como já mencionado, os HPAs podem sofrer degradação por organismos aquáticos, como bactérias e fungos, os quais são responsáveis por degradação parcial ou completa destes HPAs ²⁷. Os principais processos de distribuição e de degradação de HPAs são mostrados na figura 3.

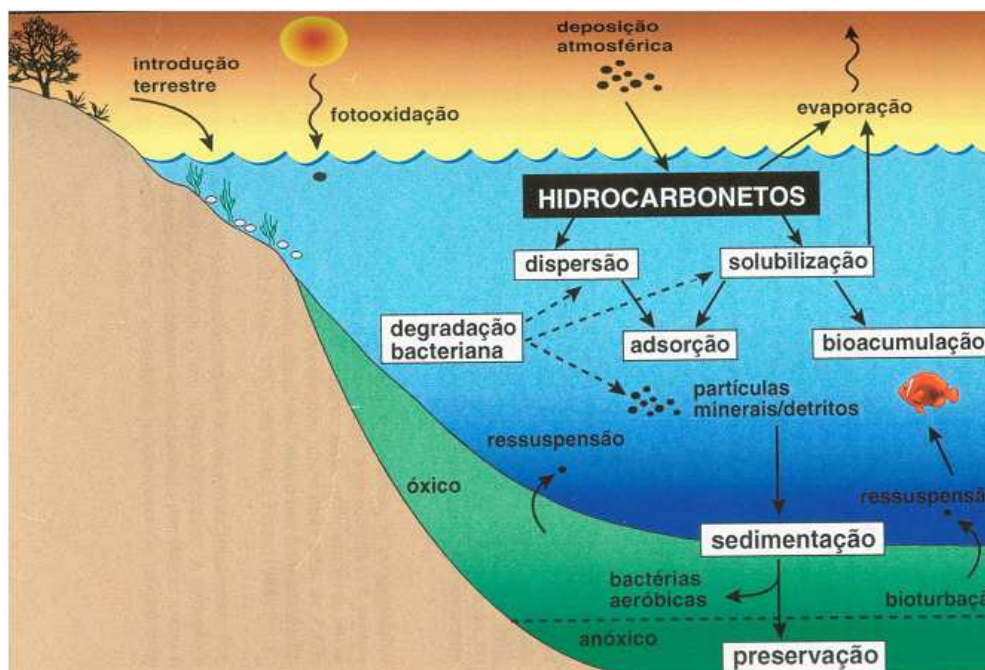


Figura 3 – Principais processos de distribuição e degradação dos HPAs no meio aquático ³⁸.

1.4.3 – Metabolização e toxicidade dos HPAs

Uma vez no ambiente marinho, os HPAs podem ser absorvidos pela biota marinha de diversas formas.

No caso dos peixes, a absorção pode ocorrer através de suas guelras e superfície corporal ou também através da ingestão de comida ou sedimentos contaminados por estes compostos ²³.

Após serem absorvidos, estes compostos são distribuídos para diversas partes do corpo destes animais. Algumas espécies aquáticas, como os peixes, têm a capacidade de metabolizar estes compostos, transformando-os em compostos mais hidrofílicos e desta forma excretáveis ²⁶.

O metabolismo dos HPAs ocorre em duas fases e o fígado é o principal órgão envolvido nesta biotransformação ³⁹. A fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise dos HPAs, catalisadas principalmente pelas enzimas do complexo citocromo P-450. A fase II da biotransformação envolve enzimas que catalisam reações de conjugação de moléculas endógenas, como a glutatona, às moléculas de HPAs ou aos metabólitos formados na fase I da biotransformação ⁴⁰. A fase I da biotransformação dos HPAs pode gerar metabólitos altamente reativos, como os epóxidos, daí a necessidade de conjugação destes metabólitos a co-fatores como glutatona, ácidos

glicurônicos etc, o que os torna mais hidrofílicos e desta forma possibilita sua secreção para a vesícula biliar, onde ficam estocados até serem excretados ^{27, 39}.

De forma geral, os HPAs são metabolizados primeiramente pelas enzimas do citocromo P-450. Nestas reações são introduzidas moléculas de oxigênio em várias posições dos HPAs, formando óxidos de areno (epóxidos). Uma vez formados estes epóxidos podem por ação das epóxidos hidrolases formar dihidrodíóis, ou ainda, espontaneamente ou pela ação da glutiona S-transferase reagir covalentemente com a glutiona ⁴¹. Durante as reações de biotransformação podem ocorrer produção de radicais, incluindo radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}) e íon hidróxido OH^- . Os dihidrodíóis podem também sofrer nova epoxidação através da ação das monooxiganases do citocromo P-450 e dar origem a epóxidos secundários (diol epóxidos) ⁴². Estes são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolisados a tetróis ²⁵. A figura 4 apresenta o metabolismo simplificado do Benzo(a)pireno.

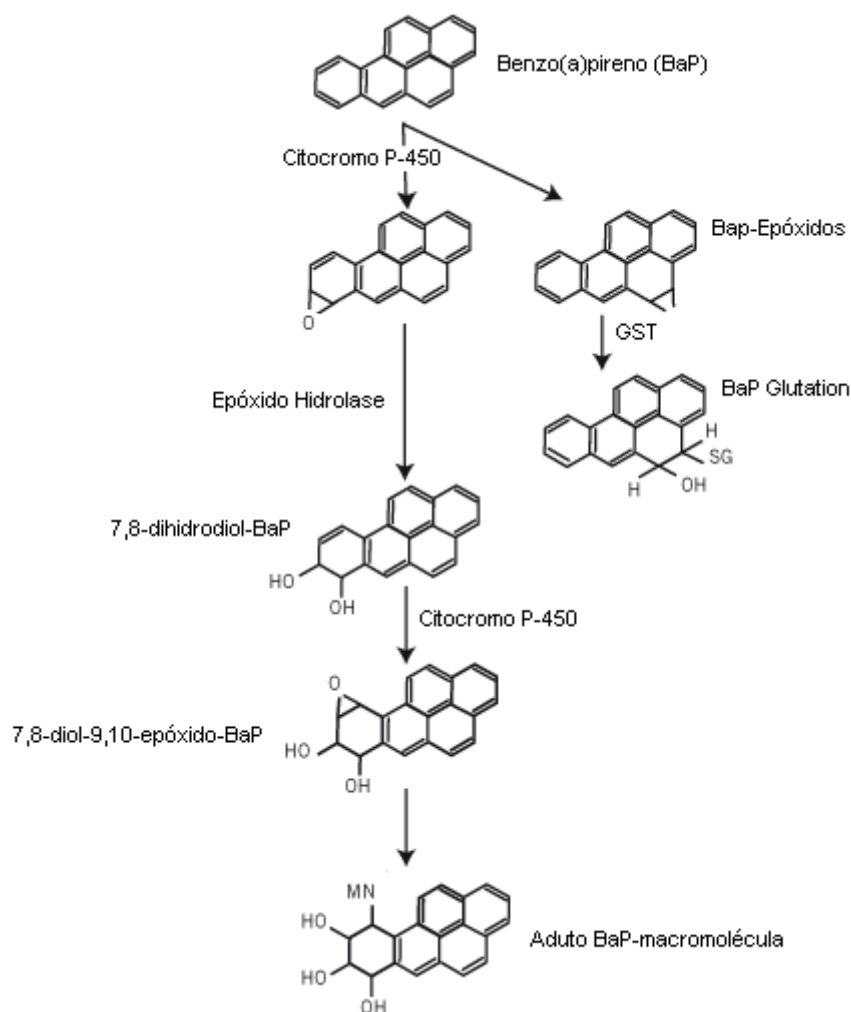


Figura 4 – Representação simplificada do metabolismo do Benzo(a)pireno.

Muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de verificar a reatividade biológica dos metabólitos do HPAs. É sabido que muitos destes metabólitos são citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Atualmente acredita-se a que citotoxicidade pode ser causada pelas espécies reativas de oxigênio formadas durante os processos de biotransformação. De todos os metabólitos de HPAs, os diol epóxidos são os mais mutagênicos, transformadores celulares e cancerígenos ⁴². Esta alta toxicidade dos dióis epóxidos tem sido explicada através da hipótese da “Região de Baía”. Esta hipótese sugere que epóxidos formados em anéis benzênicos angulares e saturados, como os do Benzo(a)pireno, podem exibir alta reatividade química. Isto porque, o anel angular forma uma área de impedimento estérico, onde oxidações ou formações de radicais podem facilmente ocorrer, enquanto a conjugação a co-fatores e conseqüente detoxicação são impedidas. Esta alta reatividade química é refletida na reatividade biológica destes compostos, tornando os dióis epóxidos, fortes candidatos a potentes carcinógenos ²⁷.

Estes intermediários reativos formados durante o processo de biotransformação podem se ligar covalentemente ao DNA celular e a outras macromoléculas, formando adutos e induzindo a danos. Os adutos de DNA têm sido considerados fator crucial na etiologia do câncer ⁴³.

Cabe ressaltar que, apesar da formação de intermediários potencialmente danosos que podem promover dano celular e toxicidade, o metabolismo oxidativo dos HPAs é um caminho essencial da detoxicação e eliminação deste composto do organismo ⁴².

Os HPAs são considerados pela Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (EPA) como poluentes prioritários para monitoramento ambiental, que representam uma ameaça à saúde e a integridade do homem e dos ecossistemas ^{44, 45}. Além disso, alguns HPAs são classificados pela Agência Internacional de Estudo do Câncer (IARC) como carcinogênicos (capazes de induzir um carcinoma, tumor maligno com tendência a produzir metástase) e/ou mutagênicos (capazes de induzir ou aumentar a frequência de mutação no cromossomo) e/ou genotóxicos (capazes de induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos) ^{27, 34}.

De fato, diversos estudos já foram conduzidos com intuito de avaliar a relação entre ambientes contaminados com HPAs e desenvolvimento de doenças hepáticas, incluindo neoplasias em peixes ^{41, 46, 47, 48}. Embora a toxicidade aguda dos HPAs seja relativamente baixa, muitos são os possíveis efeitos adversos observados em peixes

expostos a HPAs devido à sua toxicidade crônica ³⁷. Alguns destes efeitos sub-letais incluem formação de adutos com o DNA e o RNA, narcose, mortalidade em vários estágios do desenvolvimento, diminuição do crescimento, imuno-supressão, diversas deformidades, lesões do fígado, cataratas, tumores, etc ^{28,37}.

Dada a gravidade dos danos que os HPAs podem causar, surgem preocupações em relação aos impactos da contaminação aquática por estes compostos, evidenciando a necessidade de monitoramento ambiental visando avaliar os efeitos que os HPAs vêm causando na biota aquática.

1.5 – Uso de biomarcadores na avaliação da contaminação por HPAs

Durante muitos anos foram realizadas análises de HPAs nos sedimentos e superfícies das águas de áreas da costa e estuários fornecendo informações importantes sobre os níveis e fontes destes contaminantes no meio ambiente ²⁴. Entretanto, estes dados não fornecem informações sobre os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos. O monitoramento ambiental baseado exclusivamente em análises químicas das águas e sedimentos não é apropriado para a avaliação e predição dos efeitos causados por contaminantes como os HPAs ⁴⁹.

Desta forma, para avaliar os impactos que os poluentes vêm causando na qualidade dos ecossistemas é pertinente que seja avaliada a exposição dos organismos vivos destes ambientes às substâncias estressoras ⁵⁰. Neste contexto, um grupo apropriado de respostas biológicas - marcadores biológicos ou biomarcadores - pode ser útil para determinar o grau de impacto na saúde da biota, além de identificar os estressores ou poluentes responsáveis por estes efeitos ⁵¹.

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico ⁵².

De forma geral, os biomarcadores podem ser classificados como:

- **Biomarcadores de exposição:** abrangem a detecção e medida, em algum compartimento dentro do organismo, de uma substância exógena ou os seus metabólitos ou ainda o produto da interação de um agente xenobiótico e uma molécula ou célula alvo. Estes biomarcadores podem ser usados para avaliar ou confirmar a exposição de indivíduos ou populações a uma sua substância em

particular, ou um grupo de substâncias, possibilitando que seja feita a conexão entre a exposição externa e dosimetria interna ⁵³;

- **Biomarcadores de efeito:** medidas bioquímicas, fisiológicas ou outras alterações nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser associadas a uma possível deficiência ou doença. Biomarcadores de efeito podem ser usados para fundamentar tanto alterações pré-clínicas como efeitos adversos à saúde, causados por exposição externa e absorção de um químico ⁵³;
- **Biomarcadores de suscetibilidade:** são indicativos de capacidade inerentes ou adquiridas que um organismo tem de responder à exposição de uma substância química específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores, os quais alteram a suscetibilidade de um organismo à exposição. Estes biomarcadores auxiliam na elucidação de variações entre diferentes indivíduos em relação ao grau de resposta em uma exposição à determinada substância tóxica ⁵³.

Ainda com objetivos didáticos, os biomarcadores podem ser classificados em específicos e não – específicos (gerais) ⁵⁴. Estes biomarcadores gerais são usualmente indicadores dos efeitos de substâncias exógenas nos organismos vivos. Um exemplo deste tipo de biomarcador é o Fator de Condição (K), índice que avalia a condição geral de saúde dos organismos vivos. Este fator considera se a disponibilidade de comida é limitada ou se o consumo de alimentos pelos organismos vivos, como os peixes, está prejudicado devido a fatores estressores ⁵³, sendo desta forma, inespecífico para determinado estressor.

Cabe ressaltar que, a despeito das distintas classificações que os biomarcadores possam ter, sua maior importância se dá, pois estas ferramentas podem ser usadas de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com consequências ecológicas severas ⁵⁵.

Junto a isso, a avaliação dos biomarcadores antecipa mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Antes da morte ou de doença manifesta, os organismos podem responder ao stress, através de alterações moleculares, celulares, etc ⁵⁶.

Além disso, os biomarcadores são também úteis em estudos de campo que objetivam caracterizar áreas impactadas, onde uma complexa mistura de poluentes está normalmente presente ⁵⁴. A avaliação desta ferramenta fornece importantes índices da

carga total externa de contaminantes que está biodisponível para os organismos destes ecossistemas ⁵³.

Outra característica importante dos biomarcadores é que estes podem detectar exposição aos/ou os efeitos tóxicos dos compostos e seus metabólitos, que em alguns casos são rapidamente metabolizados e eliminados do organismo, como no caso dos HPAs ⁵⁷, que são metabolizados, principalmente pelo fígado, e ficam armazenados na vesícula biliar até serem excretados.

A presença destes metabólitos de HPAs na bile tem se mostrado como um fator de risco para as espécies expostas a esta classe de composto, devido a seus efeitos tóxicos. Diante disso, a análise biliar de metabólitos de HPAs representa um excelente biomarcador de exposição de organismos vivos à contaminação de ambientes aquáticos por HPAs, podendo ser utilizado de forma ampla em programas de monitoramento ambiental ⁵⁸.

1.6 – Espécies bioindicadoras para avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos por HPAs

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental. Os bioindicadores são importantes para avaliar um determinado fator antrópico ou um fator natural com potencial impactante, representando importante ferramenta na avaliação da integridade ecológica (condição de “saúde” de uma área, definida pela comparação da estrutura e função de uma comunidade biológica entre uma área impactada e áreas de referência) ⁵⁹.

Por diversas razões, espécies de peixes vêm sendo usadas como bioindicadoras em trabalhos que visem avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos. Os peixes possuem ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados, virtualmente, em qualquer ambiente aquático. Além disso, possuem importante papel ecológico na cadeia alimentar aquática, pois transportam energia dos mais baixos aos mais altos níveis tróficos ⁵³. Os peixes são fonte de alimentação para numerosas espécies, incluindo outros peixes, pássaros piscívoros, humanos e outros mamíferos. Portanto, mudanças nas populações de peixes podem levar a alterações em outras populações que dependam destes organismos como alimento ²⁸. Por estas razões, os peixes são geralmente considerados os organismos mais apropriados para avaliação de ecossistemas aquáticos poluídos.

A escolha da espécie bioindicadora pode ser feita de acordo com o objetivo do estudo a ser desenvolvido assim como por questões práticas, como abundância ou facilidade de coleta. Porém, deve ser levado em conta, que existem diferenças tanto das características fisiológicas quanto da responsividade de distintas espécies a poluição ambiental ⁵³. Por esse motivo, o conhecimento da biologia e ecologia das espécies em estudo, assim como, o uso de mais de uma espécie bioindicadora na avaliação da contaminação de ambientes aquáticos, torna-se apropriado.

Embora a avaliação dos efeitos da contaminação por HPAs já tenha sido feita através do uso de diversas espécies de peixes, aquelas que possuem presença ubíqua nos ambientes estudados, possuem hábitos bentônicos e encontram-se no topo da cadeia alimentar são mais adequadas para uso em programas de biomonitoramento ⁶⁰. Diante disso, o Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e o Linguado (*Platichthys flesus*) foram utilizados em estudos da contaminação por HPAs por Aas *et al* em 2000 ⁵⁸. Já Ruddock em 2000 utilizou peixes da família do Congro (*Conger conger*) entre outras espécies para monitoramento de um estuário no Reino Unido. Assim como estas, o Bagre (*Ictalurus punctatus*) também foi utilizado neste tipo de estudo por possuir características fundamentais neste tipo de avaliação ⁶¹.

Em relação à contaminação dos ambientes aquáticos do Estado do Rio de Janeiro por HPAs, algumas espécies de peixes parecem ser candidatas idéias a bioindicadoras. Através de seus ciclos de vida, alguns peixes se expõem a HPAs tanto no sedimento quanto na coluna d'água. Peixes demersais, como *Micropogonias Furnieri* (Corvina) e *Chilomycterus spinosus spinosus* (Baiacu de espinho), ficam diretamente em contato com o sedimento de fundo dos ambientes aquáticos além de se alimentarem de invertebrados bentônicos que acumulam HPAs. Além disso, os HPAs presentes na coluna d'água podem ser absorvidos através de suas guelras durante a transferência de oxigênio da água para seus organismos ²⁸.

1.6.1 – Corvina e Baiacu como espécies bioindicadoras da contaminação por HPAs

Como exposto acima, a Corvina e o Baiacu são espécies de peixes demersais, estando desta forma, em contato direto com os HPAs dos sedimentos. Assim, na avaliação dos efeitos da contaminação de ecossistemas aquáticos do Estado do Rio de Janeiro por HPAs, estas duas espécies de peixes mostram-se potencialmente adequadas

como bioindicadoras. A Corvina possui grande importância econômica e o Baiacu importância ecológica. Junto a isso, estes peixes têm biologia e ecologia conhecidas, além de ampla distribuição pela litoral do Estado do Rio de Janeiro durante todo o ano ⁶².

1.6.1.1 – *Micropogonias Furnieri* (Corvina)

Classificação taxonômica:

Classe: ACTINOPTERYGII

Ordem: PERCIFORMES

Família: SCIAENIDAE

Gênero: *Micropogonias*

Espécie: *Micropogonias Furnieri* (Desmarest 1823)

As corvinas possuem o corpo comprido, podendo atingir até 60 cm. Possuem coloração prateada, estrias amarelas nos flancos e pretas no dorso ⁶³.

Esta espécie demersal possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada desde o Golfo do México e Antilhas até a Argentina. Pode ser encontrada em fundos arenosos e lamacentos ao longo de toda a costa brasileira ⁶⁴.

A Corvina realiza movimentos migratórios tróficos e reprodutivos ao longo da costa, sendo que os jovens penetram nos estuários e lagunas, que constituem áreas de crescimento inicial da espécie e permanecem nesses ambientes até atingirem a maturidade sexual ⁶².

Os juvenis alimentam-se de crustáceos bentônicos e moluscos enquanto os adultos se alimentam de invertebrados bentônicos e ocasionalmente de peixes ⁶³. É uma das espécies de maior importância comercial no Atlântico sul e também uma das mais estudadas ⁶².



Figura 5 – *Micropogonias Furnieri* (Corvina) ⁶².

1.6.1.2 – *Chilomycterus spinosus spinosus* (Baiacu de espinho)

Classificação taxonômica:

Classe: ACTINOPTERYGII

Ordem: TETRAODONTIFORMES

Família: DIODONTIDAE

Gênero: *Chilomycterus*

Espécie: *Chilomycterus spinosus spinosus* (Linnaeus, 1758).

Os baiacus são peixes com morfologia diferenciada, pois possuem espinhos ósseos pelo corpo e capacidade de inflar o ventre com ar ou água para defender-se assustando o inimigo ou em situações de estresse ⁶⁵. São espécies demersais e podem atingir até 25 cm de comprimento ⁶³.

Estes peixes habitam regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo encontrados no Atlântico Sul, desde a Venezuela até a Argentina ⁶³.

Os baiacus que não possuem valor comercial direto, mas podem interferir diretamente com os grupos explorados comercialmente ⁶⁶. Além disso, são importantes na avaliação da contaminação por compostos, como os HPAs que tendem a se sedimentar, por estarem em constante contato com o substrato, além de serem encontrados de forma abundante no litoral do Estado do Rio de Janeiro.



Figura 6 - *Chilomycterus spinosus spinosus* (Baiacu de espinho) ⁶⁷.

1.7 – Metodologias de análises de HPAs em biles de peixes

A análise de metabólitos de HPAs em bile de peixes vem sendo usada para monitorar a exposição a estes compostos em diversos estudos ^{48, 68, 69}. Os métodos de análise dos metabólitos comumente utilizados são baseados na determinação da fluorescência dos HPAs ²⁶, uma vez que estes compostos são fluóroforos fortes. Esta propriedade é devida à rigidez da estrutura aromática dos HPAs, com elétrons π deslocalizados por toda a molécula ^{26, 70}.

1.7.1 – Noções elementares de Fluorescência

Quando uma molécula de HPA absorve fótons com energia apropriada, um de seus elétrons é levado a um nível de energia mais alto (S_1 ou S_2) e é dito que a molécula foi promovida a um estado excitado singlete. A molécula rapidamente perde, de forma não radiativa, a diferença de energia correspondente à passagem do nível S_2 para o nível S_1 . A partir de S_1 , o elétron retorna rapidamente ao seu estado fundamental (S_0) e a energia contida no fóton é emitida em um processo radiativo, relativamente rápido ($\sim 10^{-9}$ segundos) chamado de emissão de fluorescência ^{70, 71}. A figura 7 apresenta um diagrama simplificado dos níveis de energia eletrônica de uma molécula envolvidos no processo de fluorescência ²⁶.

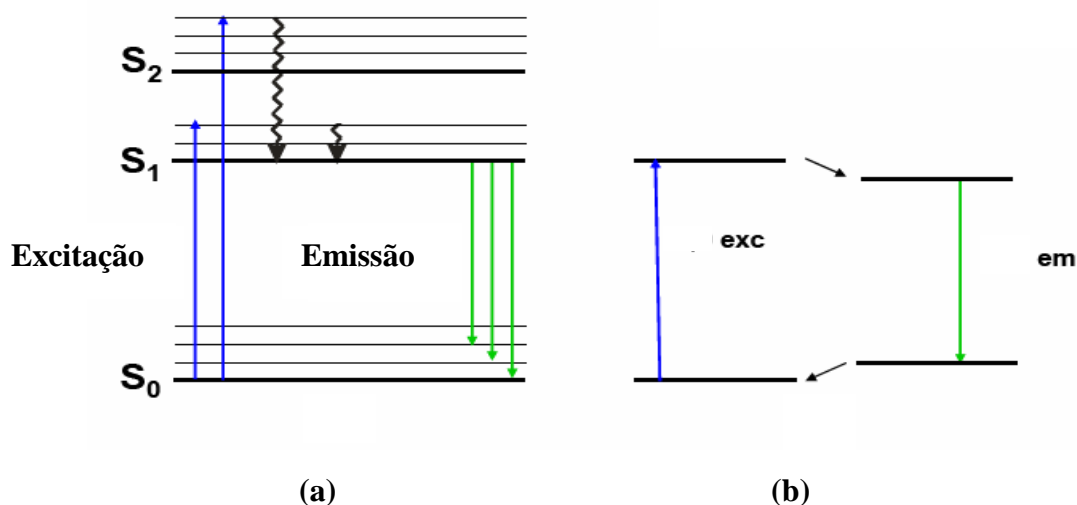


Figura 7 - Diagrama de Jablonski simplificado mostrando os níveis moleculares de energia e o processo de excitação e emissão ²⁶.

Como dito, os HPAs podem absorver energia e passar do estado fundamental (S_0) para um estado de energia superior (S_1 ou S_2). Para esta transição ocorrer, a energia absorvida deve ser igual ou maior a diferença entre o estado fundamental (S_0) e o estado excitado (S_1). Este valor é constante e característico da estrutura molecular de cada composto. Corresponde ao comprimento de onda máximo do espectro de absorção do composto em estudo e, pode ser usado como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) para obtenção do espectro de emissão de fluorescência desse HPA. A molécula excitada volta ao seu estado S_0 através da emissão de energia luminosa – emissão de fluorescência (Figura 7a). A energia máxima desta emissão ocorre para o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) máximo do espectro de fluorescência e é também característica da estrutura molecular da substância^{26, 72}. Como durante a emissão, parte da energia absorvida é perdida na forma de calor (emissão não radiativa de S_2 para S_1), a energia de emissão de fluorescência (de S_1 para S_0) é desta forma menor que a energia de excitação (no mínimo de S_0 para S_1), como mostrado na Figura 7b⁷³. Esta diferença de energia entre o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) é denominada de desvio de Stokes e é freqüentemente tomada como a diferença de comprimentos de onda, $\Delta\lambda$, usado em espectroscopia de fluorescência sincronizada²⁶.

As propriedades de excitação e emissão de um composto são fixas para um dado instrumento, condições ambientais e características da substância, podendo desta forma ser usada para identificação e quantificação destes compostos⁷³. Por estes motivos, a determinação da fluorescência biliar (tanto pela metodologia mais usual que utiliza comprimento de excitação fixo como a fluorescência sincronizada com varrimento simultâneo dos comprimentos de onda de excitação e de emissão) vem sendo utilizada em estudos de avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos por HPAs²⁶.

1.7.2 – Técnicas para avaliação de fluorescência de HPAs em bile de peixes

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para avaliar a fluorescência dos HPAs na bile dos peixes. Métodos rápidos e com custo acessível são fundamentais para monitoramentos ambientais. Krahn et al em 1987⁷⁴, introduziu o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para quantificação de metabólitos de HPAs em bile de peixes. Posteriormente, em 1996, Lin et al³⁰ compararam os métodos de HPLC e Fluorescência de Comprimento de Onda Fixo (FF) para determinação dos

metabólitos do benzo(a)pireno e naftaleno. Já em 1997, Ariese et al ⁷⁵ compararam o método de Espectrometria de Fluorescência Sincronizada (SFS) com HPLC, com intuito de analisar metabólitos de HPAs em bile de linguados expostos a sedimentos contaminados em um mesocosmo. Em 2000, Aas et al ⁴³ usaram o método FF para determinar metabólitos de HPAs em bile de peixes.

1.7.3 – Vantagens e Desvantagens do uso de Espectroscopia de Fluorescência (FF) e de Fluorescência Sincronizada (SFS) para avaliação de fluorescência de HPAs em bile de peixes

Dentre os métodos utilizados com o objetivo da avaliação da exposição a HPAs, podemos dar destaque a FF e a SFS ²⁶. Ambos os métodos são semiquantitativos, pois em determinado comprimento de onda, pode haver contribuição de fluorescência oriunda de diversos compostos que não o metabólito de HPA a ser determinado. Muito embora estes dois métodos não permitam identificar ou quantificar metabólitos de HPAs específicos, uma escolha adequada e cuidadosa dos pares de comprimentos de onda de excitação e emissão permite obter um elevado grau de seletividade no tipo de composto em análise ²⁶. Na realidade os compostos que emitem para um mesmo par de comprimentos de onda de excitação e de emissão de fluorescência incluem o HPA em questão e os seus metabólitos, derivados alquilados desse HPA e seus metabólitos e ainda compostos contendo azoto (N), enxofre (S) e oxigênio (O) e com estrutura aromática idêntica à do HPA em estudo ⁷⁶.

A técnica de FF envolve a detecção de metabólitos de HPAs utilizando pares de comprimento de onda de excitação e emissão fixos e característicos para determinado composto ⁷⁷. Já a SFS analisa os metabólitos através do escaneamento simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, o que aumenta a seletividade da análise ⁷⁵.

Estas duas técnicas são rápidas, devido à simplicidade da preparação das amostras e pouco tempo de análise das mesmas. Desta forma, um grande número de amostras pode ser avaliado, o que é de suma importância em análises de campo, onde existe extrema variabilidade biológica entre os organismos. Além disso, estas técnicas possuem baixo custo e são sensíveis permitindo discriminar peixes expostos de não expostos ²⁶.

1.8 – Influência dos fatores biológicos na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles de peixes

Em estudos que visem avaliar a exposição de peixes a HPAs devem-se levar em conta fatores que possam causar interferências nessa determinação. Em adição à variação de metabolismo existente entre distintas espécies de peixes, a influência do sexo destes organismos assim como de seu tamanho e conseqüente idade devem ser levados em conta. Junto a isso, o status alimentar dos espécimes coletados deve ser avaliado objetivando diminuir possíveis distorções na interpretação dos resultados ⁶⁰.

A condição alimentar dos peixes em estudo deve ser levada em conta pois, após a metabolização dos HPAs pelo fígado estes, como já mencionado, ficam armazenados na vesícula biliar até serem excretados. Em seguida a alimentação a vesícula biliar será esvaziada no intestino. Porém, depois deste esvaziamento da vesícula, esta se enche de água, o que significa que o fluido biliar estará agora muito diluído assim como os metabólitos a serem mensurados. Este efeito pode gerar viés na interpretação dos dados obtidos o que faz com que seja necessário avaliar parâmetros adequados que normalizem a concentração dos metabólitos. A determinação dos níveis de proteína na bile pode ser usada como parâmetro de normalização, uma vez que a concentração de proteína na bile é dependente do status alimentar do organismo em estudo ⁷⁵.

1.9 – Considerações gerais sobre a relevância do estudo

O biomonitoramento é uma ferramenta fundamental para distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos.

O uso de ferramentas, como os biomarcadores, que avaliem de forma precoce os danos que os poluentes vêm causando na biota aquática é de extrema importância, e vêm sendo cada vez mais utilizadas em programas ambientais em diversos países como os E.U.A., Comunidade Européia, Austrália, etc.

Levando em conta fatores como características de distribuição, ecologia, biologia, status alimentar e espécies bioindicadoras, além das peculiaridades inerentes ao método de análise, a avaliação dos efeitos da contaminação por HPAs em áreas de grande importância social, econômica e ecológica, como o litoral do Estado do Rio de Janeiro, mostra-se cada vez mais necessária e apropriada. A realização de estudos que

utilizam biomarcadores é fundamental para o real conhecimento dos impactos causados pelos poluentes, pré-requisito essencial para um efetivo plano de conservação e restauração destes ecossistemas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar o uso de metabólitos de HPAs das biles de peixes como biomarcadores de exposição na Baía de Guanabara.

2.2 – Objetivos específicos

- Implementar e otimizar a metodologia de fluorescência para determinação dos metabólitos de HPAs nas espécies de Baiacu e Corvina;
- Avaliar a possibilidade de uso de duas espécies de peixes como bioindicadoras da contaminação por HPAs em ambientes marinhos, avaliando, para tanto, a relação entre as concentrações dos metabólitos de HPAs biliares e parâmetros biológicos e biométricos.
- Avaliar diferenças do nível de exposição dos organismos em estudo à contaminação por HPAs presentes na Baía de Guanabara e em uma região controle (Itaipu).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Reagentes

- Álcool etílico grau HPLC, pureza 99,9% marca Merck
- Água Milli-Q
- Padrão de Naftaleno marca AccuStandard
- Padrão de Pireno marca Sigma Aldrich
- Padrão de Benzo(a)pireno marca Sigma Aldrich
- Padrão de 1-Hidroxipireno marca Sigma Aldrich
- Carbonato de sódio anidro marca Vetec
- Sulfato de cobre marca Sigma Aldrich
- Tartarato de sódio e potássio marca Isofar
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) marca Sigma Aldrich
- Hidróxido de sódio marca Vetec
- Padrão de albumina bovina marca Sigma Aldrich
- Reagente de Folin & Ciocalteu marca Sigma Aldrich

3.2 – Materiais

Foram utilizados balões volumétricos, pipetas volumétricas e pipetas automáticas de diversas capacidades para preparação das soluções utilizadas. Usaram-se também bechers de diferentes volumes, além de bastão de vidro, espátulas, tesouras e tubos Eppendorf®.

Para calibração do espectrofluorímetro utilizaram-se padrões de Naftaleno e de Rodamina certificados pela Perkin Elmer. Estes padrões são blocos de polimetilmetacrilato contendo os devidos compostos fluorescentes. Este material acompanha um manual onde podem ser verificados os comprimentos de onda de excitação dos padrões e seus respectivos espectros de fluorescência.

Os ensaios de fluorescência foram realizados em cubeta de quartzo, de 1 cm, para fluorescência.

3.3 – Equipamentos

- Espectrofluorímetro LS 45 Perkin Elmer (operação em geometria de transmissão; equipado com porta amostras para células de 1 cm; fendas fixas de 10 nm; aquisição de espectros de 200 nm a 650 nm). Este espectrofluorímetro permite obter 3 tipos de espectros ⁷⁸:
 - Espectros de Emissão de Fluorescência (varrimento do comprimento de onda de análise a um comprimento de onda de excitação fixo).
 - Espectros de Emissão de Fluorescência Sincronizada (varrimento simultâneo dos monocromadores de excitação e de análise, com uma diferença de comprimentos de onda fixa, $\Delta\lambda$, que normalmente traduz a diferença de comprimentos de onda entre os máximos do espectro de excitação, ou de absorção, e de fluorescência).
 - Espectros de Excitação (varrimento do comprimento de onda de excitação a um comprimento de onda de análise fixo)
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601
- Balança digital marca Marte com 3 casas decimais e/ou balança analítica de precisão marca Mettler com 4 casas decimais
- Banho de sonicação marca Branson
- Agitador de tubos marca Phoenix

3.4 – Amostragem e extração da bile

Foram realizadas coletas mensais de Corvinas e Baiacus-de-espinho na Baía de Guanabara e em Itaipu (figura 8A e 8B) durante os meses de maio a dezembro de 2007. As coletas em ambas as regiões estudadas foram realizadas através de arrastos com rede por pescadores da região. Na Baía de Guanabara os pescadores da colônia de pescadores Z-10 realizaram as coletas próximas à região da Ilha do Governador e também próximo a Magé. Já em Itaipu, as coletas foram realizadas por membros da colônia Z-7 que coletaram espécimes de ambos os peixes na própria Praia de Itaipu.



Figura 8 – Imagens da Baía de Guanabara (A) e da Praia de Itaipu (B) ^{79, 80}.

Após as amostragens, os peixes foram levados, em banho de gelo, diretamente para o laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Ao chegar ao laboratório, os peixes foram pesados e medidos. Os espécimes foram então abertos e sexados através da observação macroscópica de suas gônadas. As vesículas biliares foram extraídas e armazenadas, em tubos Eppendorf[®], no freezer, à temperatura de -20°C , temperatura ideal para manter a estabilidade das

amostras, até ao momento posterior da análise ⁸¹. A figura 9 mostra etapas do processo de manipulação das amostras coletadas no laboratório de Ecotoxicologia.

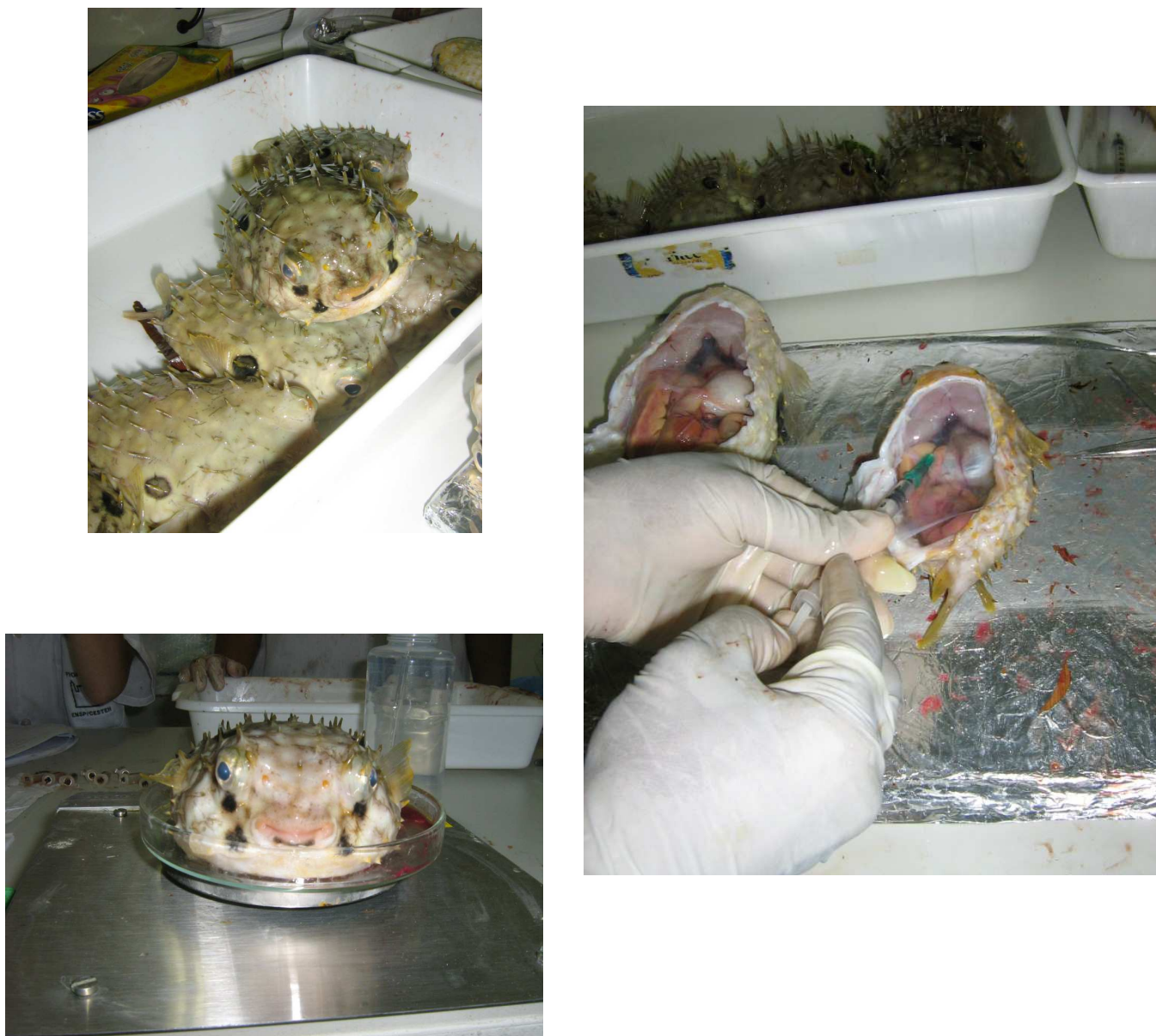


Figura 9 – Imagens das etapas de manipulação como pesagem, sexagem e retirada da bile de uma das espécies bioindicadoras.

Para realização da determinação dos metabólitos biliares as amostras foram descongeladas em banho de gelo e devidamente preparadas, como explicado posteriormente (item 3.11).

3.5 – Determinação do Fator de Condição (K)

O fator de condição, K, relaciona o peso do organismo com o seu tamanho. Para o cálculo do K foi, primeiramente, calculada a equação:

$$W = \alpha \times L^{\beta}$$

onde W representa a média dos pesos dos peixes em gramas e L, a média de seus comprimentos em centímetros. Após o cálculo desta equação foi obtido o β necessário ao cálculo do Fator de Condição, através da seguinte fórmula ⁸² :

$$K = \text{peso (g)} / \text{comprimento (cm)}^{\beta}$$

3.6 – Escolha dos HPAs utilizados na avaliação da exposição de peixes

Para a avaliação da exposição dos peixes, foram analisados os metabólitos de HPAs de 2, 4 e 6 anéis, ou seja, metabólitos do tipo Naftaleno, metabólitos do tipo Pireno e metabólitos do tipo Benzo(a)pireno, respectivamente. Além disso, foi escolhido analisar, especificamente, o principal metabólito do Pireno, o 1-Hidroxi-pireno ^{58, 83}. Foi escolhido fazer a determinação destes metabólitos, pois estes representam tanto os HPAs oriundos do petróleo, como o Naftaleno, como os de origem pirogênica (Pireno e Benzo(a)pireno) ³⁰. Além disso, estes HPAs já vêm sendo utilizados em muitos estudos de avaliação da contaminação ambiental através do uso de fluorescência biliar de peixes ^{30, 48, 58, 69}.

3.7 – Preparação dos padrões de HPAs

Para preparação de soluções padrão dos HPAs, quantidades apropriadas dos padrões de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxi-pireno foram pesadas em balança analítica e foram diluídas com etanol. O etanol foi o solvente escolhido para o preparo das soluções, pois além de ser de fácil aquisição e custo relativamente baixo, é comumente utilizado em avaliações onde há determinação de HPAs em bile de peixes ^{23, 26, 58, 83}. Depois de solubilizar os HPAs acrescentou-se à solução, água Milli-Q, de modo que fosse obtido etanol a 50%. Esta mistura etanol/água (50:50 volume:volume) foi considerada por Ariese (1993) ⁸³ como possuindo a polaridade apropriada para solubilizar todos os constituintes da bile e obter amostras límpidas.

3.8 – Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Anterior à análise das biles dos peixes foram determinados os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) ideais para a avaliação em biles dos metabólitos de HPAs de 2, 4 e 6 anéis.

Para tanto, foram preparadas soluções padrão de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno. Foram escolhidas concentrações previamente testadas no espectrofluorímetro e dentro da faixa de leitura do equipamento.

Após a preparação das soluções padrão, como explicado no item 3.7, estas foram levadas para determinação de suas intensidades de fluorescência no espectrofluorímetro. As mesmas foram mantidas ao abrigo da luz, com intuito de evitar degradação dos padrões, até que fossem realizadas as respectivas leituras. Como referido no item 3.3, o espectrofluorímetro permite medir tanto espectros de emissão de fluorescência comuns como também espectros de emissão de fluorescência sincronizada. Embora estas sejam as designações corretas destas duas técnicas de emissão de fluorescência ^{71, 72}, geralmente na bibliografia relativa à determinação de metabólitos de HPAs em biles de peixes, estas técnicas são designadas respectivamente por Fluorescência Fixa, FF, (devido ao fato do seu comprimento de onda de excitação ser fixo) e por espectroscopia de fluorescência sincronizada, SFS; siglas estas que serão freqüentemente usadas ao longo deste trabalho ^{38, 58, 83}.

Cabe ressaltar que, anterior a qualquer análise realizada, diariamente o equipamento foi calibrado através do uso de padrões comerciais de Naftaleno e Rodamina, padrões estes certificados pela Perkin Elmer. Este procedimento foi adotado com intuito de garantir que as condições de análises fossem sempre as mesmas.

Para seleção dos pares de λ_{exc} e λ_{em} ideais, foi realizado a varredura em solução padrão de Naftaleno, de Pireno, de Benzo(a)Pireno, através do método de FF. Esta varredura foi realizada da seguinte forma:

O λ_{exc} de cada um dos padrões foi fixado em 200 nm e então varreu-se λ_{em} de 220 a 600 nm. Após esta primeira corrida, fixou-se o λ_{exc} em 220 e foi obtida nova varredura de emissão, agora de 240 a 600 nm. Este esquema foi realizado várias vezes, variando o λ_{exc} de 20 em 20 nm. Após esta etapa foram observados os λ_{em} máximos e avaliado qual o melhor comprimento de onda de emissão de cada composto (máximo de sua banda de emissão de fluorescência) e seu melhor comprimento de onda de excitação (aquele que permite obter maior intensidade de fluorescência no comprimento de onda máximo da sua banda de emissão de fluorescência). Desta forma, foram determinados

os melhores pares de comprimento de onda de excitação e de análise para o Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno.

Para determinar os parâmetros de análise ideais do 1-Hidroxipireno pelo método SFS, foram realizadas varreduras de 200 a 600 nm da solução padrão nos $\Delta\lambda$ de 37, 45 e 52 nm. Estes $\Delta\lambda$ testados são os recomendados por outros autores em estudos semelhantes^{26, 34, 58, 75}. Desta forma, foi possível confirmar qual o $\Delta\lambda$ ideal para o nosso sistema e em qual comprimento de onda é melhor visualizado o espectro de fluorescência sincronizada do 1-Hidroxipireno.

É importante salientar que foram registrados todos os espectros de emissão e excitação medidos, assim como todos os espectros de fluorescência sincronizada.

3.9 – Curvas Padrão

Foram feitas curvas de calibração dos quatro composto em estudo (Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno), a partir de uma série de diluições das soluções padrão preparadas no dia da análise (ver item 3.7). A partir destas soluções, foram feitas diluições seriadas com água/etanol 50:50 (volume:volume) para cada um dos padrões.

As concentrações utilizadas para realização de cada uma das quatro curvas variaram de acordo com a faixa de leitura para cada um destes HPAs. Desta forma, para o Naftaleno foram feitas diluições com pontos de concentração variando de 1,3 $\mu\text{g/L}$ a 38,4 $\mu\text{g/L}$, para o Pireno de 0,2 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$, para o Benzo(a)pireno de 0,25 $\mu\text{g/L}$ a 20 $\mu\text{g/L}$, e para o 1-Hidroxipireno de 0,1 $\mu\text{g/L}$ a 2,6 $\mu\text{g/L}$.

As diferentes diluições, de cada um dos padrões, foram medidas no espectrofluorímetro através do método de FF para os padrões de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e por SFS para leitura do 1-Hidroxipireno. A escolha da metodologia de análise de fluorescência foi feita com base em trabalhos similares anteriormente publicados^{26, 58, 83}. Estas análises foram realizadas nos comprimentos de onda escolhidos no experimento citado anteriormente (item 3.8).

As curvas de calibração foram repetidas pelo menos três vezes, em dias diferentes, e o resultado da equação da reta obtido foi feito a partir da média das concentrações obtidas nas distintas análises.

3.10 – Efeitos de adição padrão

3.10.1 – Adição de padrão em biles

Foi realizado um experimento a fim de observar se os comprimentos de ondas previamente determinados são ideais na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles dos peixes capturados.

O experimento foi realizado através da adição de solução padrão de cada um dos quatro HPAs em estudo, em concentrações distintas, sobre biles de peixes. Desta forma, foram realizados quatro experimentos separados, porém todos seguindo a mesma lógica.

Aleatoriamente, foram escolhidas biles de Corvina e Baiacu. Estas foram preparadas para análise convencional, ou seja, descongelamento seguido de 15 minutos de sonicação e diluição com água/etanol (50:50; volume:volume). Cabe ressaltar que a etapa de preparação das biles para análise será explicada com maiores detalhes posteriormente (item 3.11).

Estas biles foram analisadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão pré escolhidos para o Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno, determinados por FF e para o 1-Hidroxipireno por SFS.

Após esta etapa adicionou-se a estas biles solução padrão de Naftaleno na concentração de 1,3 µg/L e realizou-se leitura de cada uma das amostras (de biles) no par de comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) previamente determinado, característico do Naftaleno. Após esta leitura, adicionou-se nova concentração de Naftaleno e repetiu-se a leitura. Uma nova adição padrão foi feita e novamente a leitura.

A mesma lógica experimental foi seguida para adições de Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno.

3.10.2 – Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda

Outra série de experimentos foi realizada para avaliar se a fluorescência de um dos quatro metabólitos de HPAs em estudo podia influenciar na leitura de fluorescência dos demais compostos, nas determinações biliares realizadas.

Para esta análise, escolheram-se novamente de forma aleatória biles de Corvina e Baiacu e estas foram preparadas e determinadas de forma convencional, ou seja,

avaliando a presença dos metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno por FF e o 1-Hidroxipireno por SFS.

Após esta leitura, adicionou-se a estas biles solução padrão de Naftaleno a concentração de 1,3 µg/L e desta vez, realizou-se leitura de cada uma das amostras (biles) nos comprimentos de onda característico de todos os HPAs em estudo (Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno). Foram adicionadas duas outras concentrações de Naftaleno, sequencialmente, e foram feitas novas leituras.

De forma geral podemos resumir este experimento da forma a seguir: mediu-se a bile e adicionou-se uma primeira concentração (menos concentrada) de um dos HPAs. Depois, então, esta mistura foi determinada no comprimento de onda específico do padrão adicionado e também nos comprimentos de onda dos outros HPAs estudados. Foram adicionadas sucessivamente, duas outras concentrações (de forma crescente de concentração) deste padrão e repetida a leitura de fluorescência no mesmo esquema anterior. Este trabalho foi feito para todos os padrões de HPAs em estudo (Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno).

3.11 – Preparação de biles para análise e determinação dos metabólitos de HPAs de Corvina e Baiacu

As biles dos peixes coletados foram descongeladas e sonicadas por 15 minutos. Após a sonicação estas foram diluídas em água/etanol 50:50 (volume:volume). Para a leitura dos metabólitos de Pireno, Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxipireno as amostras foram diluídas 1000 vezes. Já para análise dos metabólitos de Naftaleno foi preciso diluir, a maioria das amostras, 5000 vezes, entretanto, algumas biles tiveram que ser diluídas 10.000 vezes.

As diluições das biles foram necessárias não só para que a intensidade de fluorescência das amostras ficasse dentro da faixa de leitura do equipamento, mas também para impedir que ocorresse efeito de matriz. Este efeito é referido à absorção da luz que entra na cubeta, durante a medida de fluorescência, por outros constituintes presentes nas amostras de biles que não os HPAs⁵⁸.

Trabalhos recentes de outros autores³⁴ mostraram que as diluições usadas no presente estudo são adequadas e suficientes para impedir o referido efeito de matriz. Desta forma, não se considerou necessário realizar novos testes relacionados a este parâmetro.

Após esta etapa, as amostras diluídas foram analisadas em cubeta de quartzo no espectrofluorímetro. Foram realizadas leituras de cada uma das biles coletadas para todos os pares de comprimentos de onda de excitação e emissão, definidos anteriormente, através do método de FF, visando analisar a intensidade de fluorescência dos metabólitos do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno presentes nas amostras. Da mesma forma, as biles diluídas foram analisadas para avaliar a presença do 1-Hidroxi-pireno por SFS utilizando o $\Delta\lambda$ ideal.

Os espectros de FF e SFS foram registrados. Para cada espectro de emissão foi medida a intensidade de fluorescência ao λ_{em} de cada composto, previamente escolhido para os vários padrões de HPAs. Como dito anteriormente este λ corresponde ao máximo da banda de emissão de fluorescência de cada composto. Os resultados obtidos nestas leituras foram expressos em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência.

Após a obtenção das curvas padrão para cada um dos HPAs já referidos (ver item 3.9) foi possível calcular as concentrações dos metabólitos das biles a partir da intensidade de fluorescência no λ_{em} de cada composto. Uma vez que estes métodos (FF e SFS) são semiquantitativos, as concentrações dos metabólitos das biles foram expressas em equivalentes dos respectivos padrões de HPAs, isto é, como equivalentes de Naftaleno, equivalentes de Pireno, equivalentes de Benzo(a)pireno e equivalentes do 1-Hidroxi-pireno.

3.12 – Determinação de proteínas totais e normalização do status alimentar

A determinação de proteínas da bile foi feita através do método de Lowry modificado por Peterson ⁸⁴. O protocolo utilizado segue a referência do método de Peterson citado (consultar para detalhes), mas de forma geral, a determinação foi realizada da seguinte forma:

Foram feitas soluções de carbonato de sódio, sulfato de cobre, tartarato de sódio e potássio, SDS e hidróxido de sódio, todos utilizados para preparação de uma nova solução chamada de “Reagente A”. Também foi necessário preparar padrão de albumina na concentração de 1 mg/mL.

Com o padrão de albumina foi preparada uma curva com dois pontos de concentração, chamados de P10 e P100, pois foram adicionados 10 μ L e 100 μ L do padrão de albumina, em tubos contendo água destilada para um volume final de 1,0 mL.

As amostras de bile foram diluídas 10 vezes em água Milli-Q e a cada amostra (incluindo a curva de albumina) foi adicionado Reagente A. Transcorridos 10 minutos,

adicionou-se o reagente de Folin & Ciocalteu às amostras, previamente diluído em água Milli-Q, sob agitação em um agitador de tubos. Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

A quantificação de proteína na amostra foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = (I \times A)^S,$$

em que os parâmetros S e I são dados por:

$$S = \log (h / l) / \log (A750h / A750l) \text{ e,}$$

$$I = \text{antilog} ((\log h) / S - \log A750h)$$

onde h e l são respectivamente a maior e a menor quantidade do padrão de albumina, A750h e A750l os seus respectivos valores de absorvância a 750 nm e A é a absorvância da amostra ⁸⁴.

Após a determinação das proteínas biliares totais foram calculadas as concentrações destas proteínas em $\mu\text{g/mL}$, seguindo a fórmula acima indicada. Para normalização do status alimentar foi obtida a razão entre os valores de concentração de cada metabólito de HPAs e a respectiva concentração de proteína para ambas as espécies de peixes estudadas.

Com intuito de comparar a dispersão das concentrações dos metabólitos de HPAs obtidas calculou-se os coeficientes de variação de cada metabólito, antes e após a normalização pela proteína. O percentual do coeficiente de variação foi calculado através da divisão do desvio-padrão pela média da concentração de cada metabólito de HPAs e multiplicação deste resultado por 100.

3.13 – Análises estatísticas

Os dados obtidos foram trabalhados no software SPSS 12.0. Foram calculados médias e desvios e erros padrão das médias para os dados obtidos. Realizaram-se também análises como avaliação de correlação entre variáveis. A comparação entre grupos distintos foi feita utilizando testes paramétricos, como o Teste T – Student. Diferenças entre as variáveis estudadas foram consideradas estatisticamente significativas para um p-valor $\leq 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Parâmetros analíticos utilizados na determinação de HPAs

4.1.1 – Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Os HPAs escolhidos para avaliação da exposição dos peixes foram o Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxi-pireno (item 3.6). Utilizando espectroscopia de fluorescência com comprimento de onda de excitação fixo (FF), foram obtidos como pares ideais de comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) (item 3.8) 270/335 nm, 340/390 nm, 380/430 nm respectivamente para avaliação de metabólitos do tipo Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno (figuras 10A, 10B e 10C). Como se pode ver na figura 10, estes pares de comprimentos de onda correspondem às intensidades de excitação e emissão máximas para cada um destes HPAs.

Para avaliação do 1-Hidroxi-pireno pelo método de fluorescência sincronizada (SFS) foi escolhido o $\Delta\lambda = 37$ nm, pois em comparação com os outros $\Delta\lambda$ testados de 45 e 52 nm, o $\Delta\lambda = 37$ nm revelou espectros mais estreitos, ou seja, mais seletivos para análise do metabólito em questão. Além disso, como já referido este é também o $\Delta\lambda$ mais freqüentemente na literatura. O comprimento de onda onde o espectro deste composto é visualizado de forma otimizada é 350 nm (figura 11).

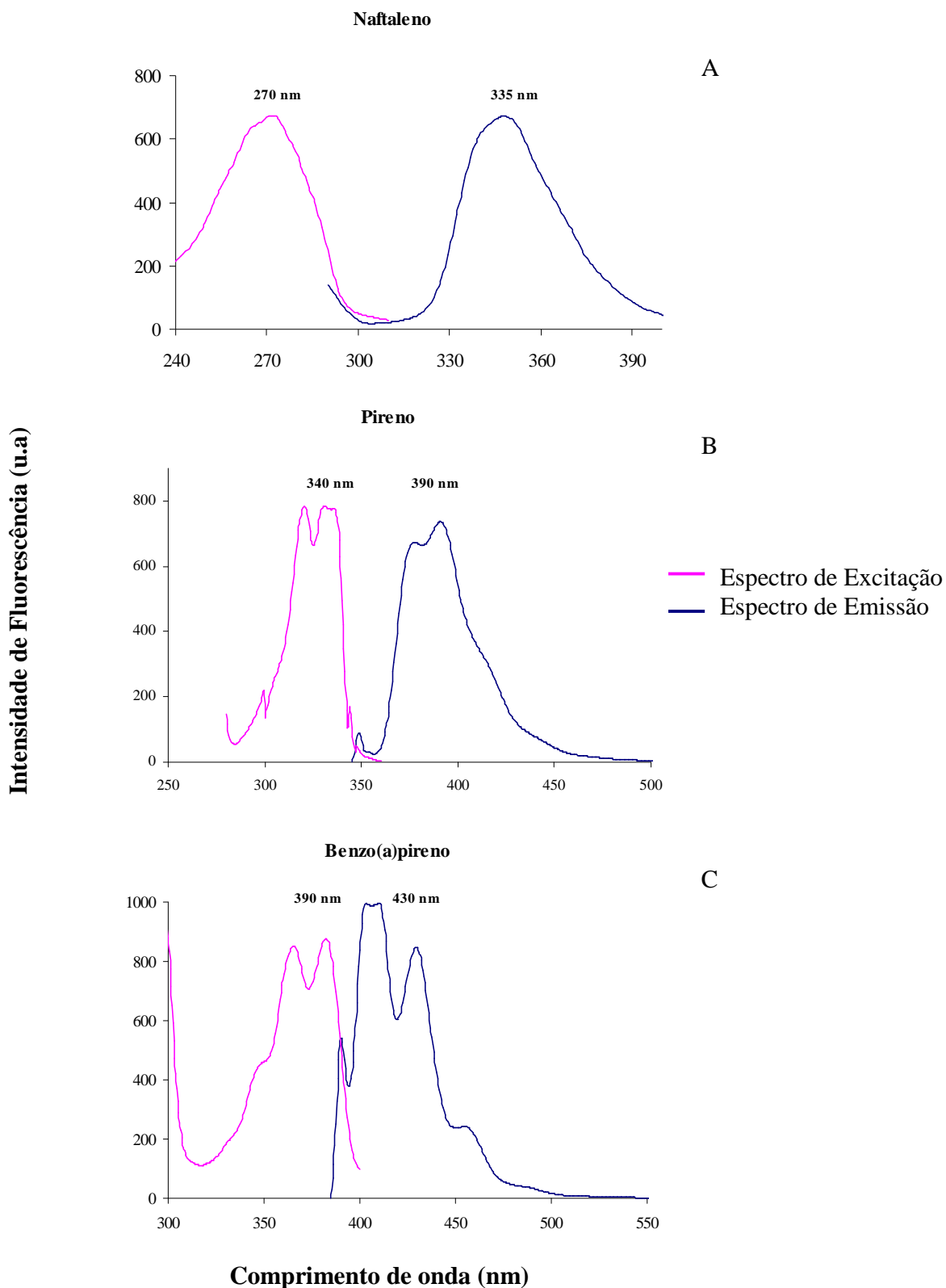


Figura 10 – Espectros de excitação e emissão. **A** – excitação ($\lambda_{exc} = 270$ nm) e emissão ($\lambda_{em} = 335$ nm) do Naftaleno; **B** – excitação ($\lambda_{exc} = 340$ nm) e emissão ($\lambda_{em} = 390$ nm) do Pireno; **C** – excitação ($\lambda_{exc} = 380$ nm) e emissão ($\lambda_{em} = 430$ nm) do Benzo(a)pireno.

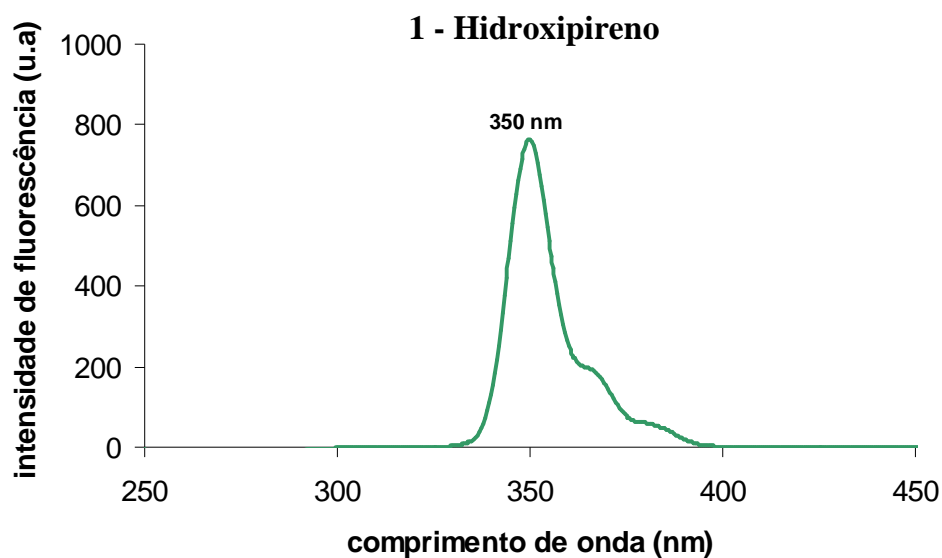


Figura 11 – Espectro de fluorescência sincronizada do 1 – Hidroxipireno, $\Delta\lambda= 37$ nm.

4.1.2 – Curvas padrão

Como mencionado na Metodologia deste trabalho (item 3.9) foram realizadas curvas analíticas de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno pelo modo FF e do 1-Hidroxipireno por SFS. As figuras 12A, 12B, 12C e 13 demonstram os espectros de fluorescência obtidos das soluções padrão do Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e o espectro de fluorescência sincronizada do 1-Hidroxipireno, respectivamente. Os espectros são apresentados em intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias (u.a.).

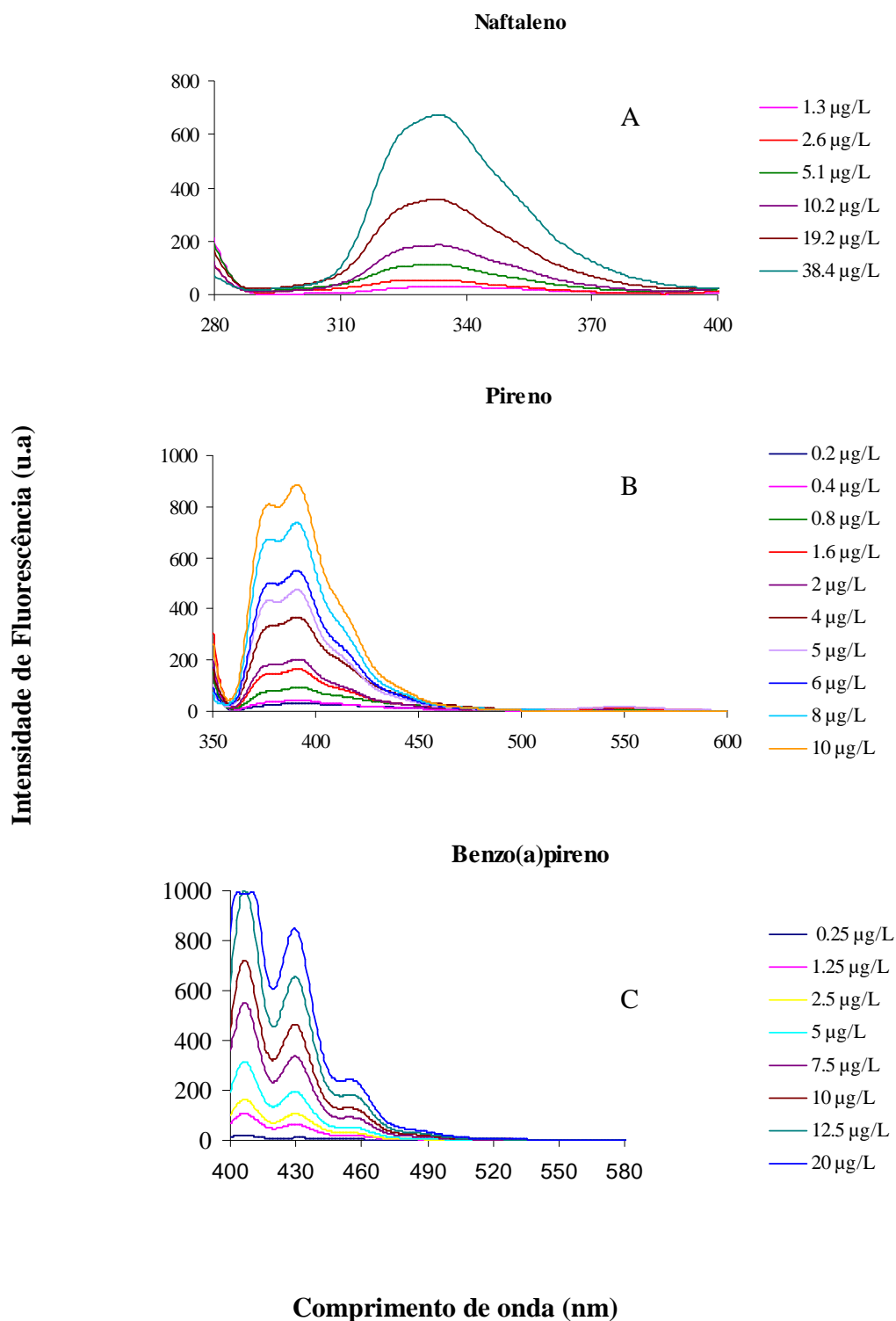


Figura 12 – Espectros de emissão de Fluorescência Fixa (FF) das concentrações crescentes do padrão do **A** – Naftaleno ($\lambda_{exc} = 270$ nm); **B** – Pireno ($\lambda_{exc} = 340$ nm); **C** – Benzo(a)pireno ($\lambda_{exc} = 380$ nm).

1- Hidroxipireno

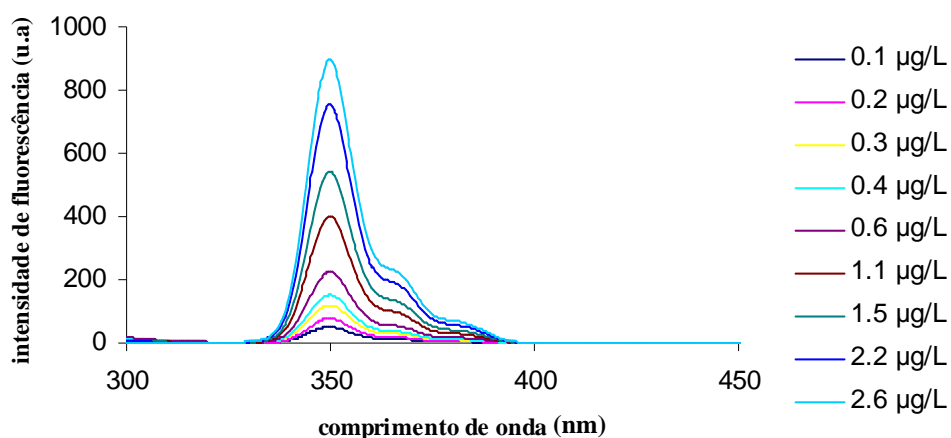


Figura 13 – Espectros de fluorescência (SFS) de concentrações crescentes do padrão do 1-Hidroxipireno.

As retas de calibração foram construídas a partir dos máximos de intensidade de fluorescência, medidos aos λ de emissão previamente escolhidos.

Os parâmetros das curvas analíticas obtidas, como equação da reta e coeficiente de correlação (r^2), para os quatro compostos em estudo estão expostos na tabela 2.

Tabela 2 – Equações da reta e coeficiente de correlação das curvas padrão dos quatro compostos em estudo.

HPA	Equação reta	r^2
Naftaleno	$y = 13,788x + 40,123$	0,9901
Pireno	$y = 88,644x + 17,653$	0,9968
Benzo(a)pireno	$y = 41,292x + 18,528$	0,9912
1-Hidroxipireno	$y = 343,24x + 8,082$	0,9994

4.2 – Avaliação do efeito de adição padrão

4.2.1 – Adição de padrão em biles

Para avaliar se os pares de comprimentos de onda escolhidos com os padrões de HPAs (item 4.1.1) são ainda os ideais na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles dos peixes capturados foram realizados experimentos de adição de padrão a amostras de biles. Desta forma, pôde-se avaliar se a matriz bile causa modificação nos comprimentos de ondas determinados como apropriados para a leitura dos metabólitos de HPAs.

Os resultados desta análise demonstraram que na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles medidas, os picos apresentam-se nos mesmos comprimentos de onda que os picos de fluorescência obtidos pelos padrões de HPAs. Os gráficos 13A, 13B, 13C e 13D exibem os espectros de emissão da bile e das adições de padrão realizadas.

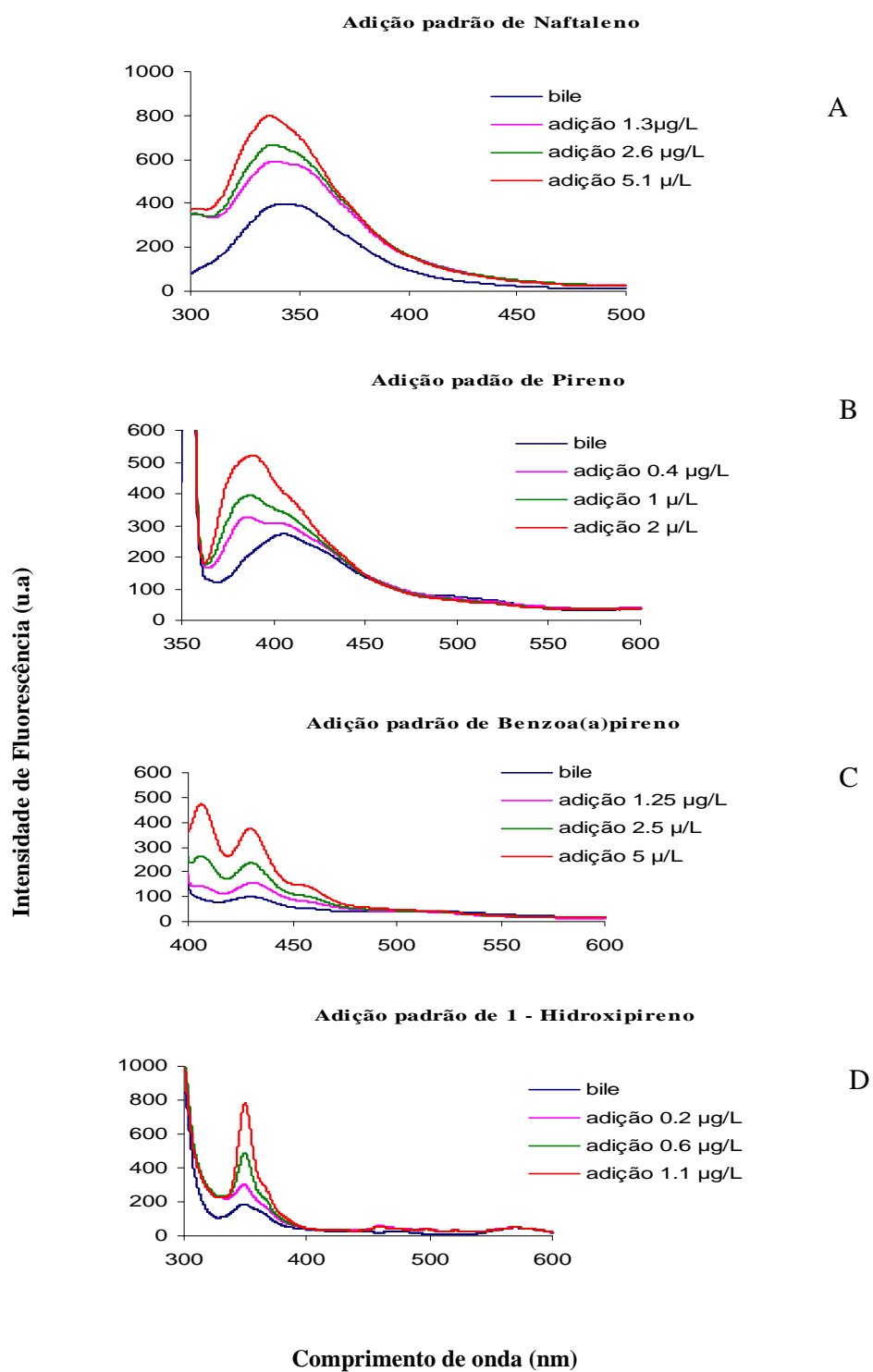


Figura 14 – Espectro de emissão de fluorescência de uma amostra aleatória de bile (curva azul) e das adições do padrão de **A** – Naftaleno sobre bile ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335 nm); **B** – Pireno sobre bile ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 340/390 nm); **C** – Benzo(a)pireno sobre bile ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 380/430 nm); **D** – 1-Hidroxipireno sobre bile ($\lambda=350\text{nm}$ e $\Delta\lambda=37$ nm).

4.2.2 – Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda

Ainda utilizando a adição de padrões de HPAs sobre a bile previamente determinada, avaliou-se a especificidade dos comprimentos de onda anteriormente escolhidos com os padrões de HPAs (item 4.1.1) para determinação dos metabólitos de HPAs. Desta forma, pretendeu-se observar se a fluorescência obtida na determinação dos metabólitos de HPAs na bile estava livre de interferências de fluorescência causadas por outros metabólitos em estudo.

Os resultados mostraram que para as adições de Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno não houve influência de nenhum destes compostos nas leituras dos outros metabólitos (figuras 15A, 15B e 15C). Entretanto, quando observamos a adição do padrão de 1-Hidroxi pireno, mostrada na figura 15D, pôde-se notar que houve não só aumento de fluorescência do 1-Hidroxi pireno, como esperado, como também do Pireno e do Naftaleno.

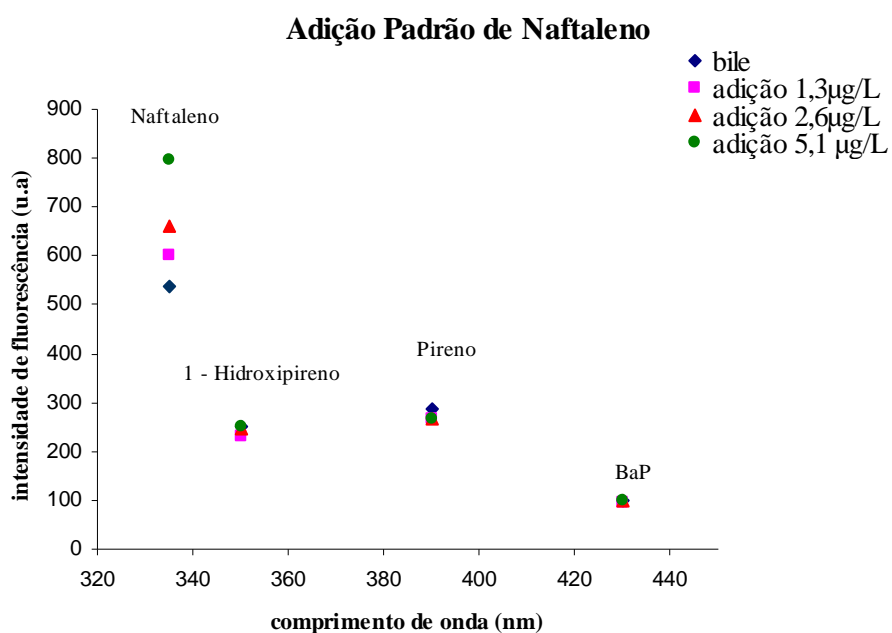


Figura 15A – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Naftaleno sobre bile e leitura realizada nos $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335, 340/390, 380/430 nm através de FF e pelo modo SFS com $\Delta\lambda=37$ nm.

Adição padrão de Pireno

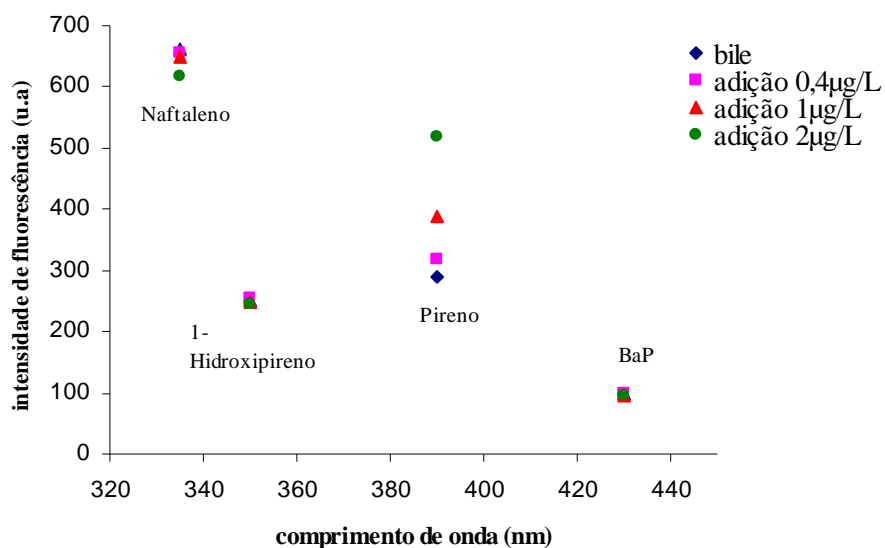


Figura 15B – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Pireno sobre bile e leitura realizada nos $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335, 340/390, 380/430 nm através de FF e pelo modo SFS com $\Delta\lambda=37$ nm.

Adição padrão de BaP

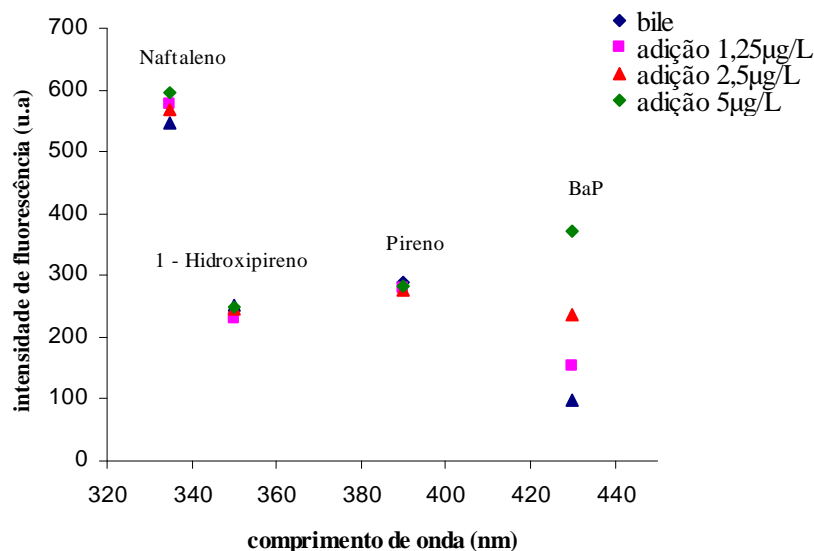


Figura 15C – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Benzo(a)pireno sobre bile e leitura realizada nos $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335, 340/390, 380/430 nm através de FF e pelo modo SFS com $\Delta\lambda=37$ nm.

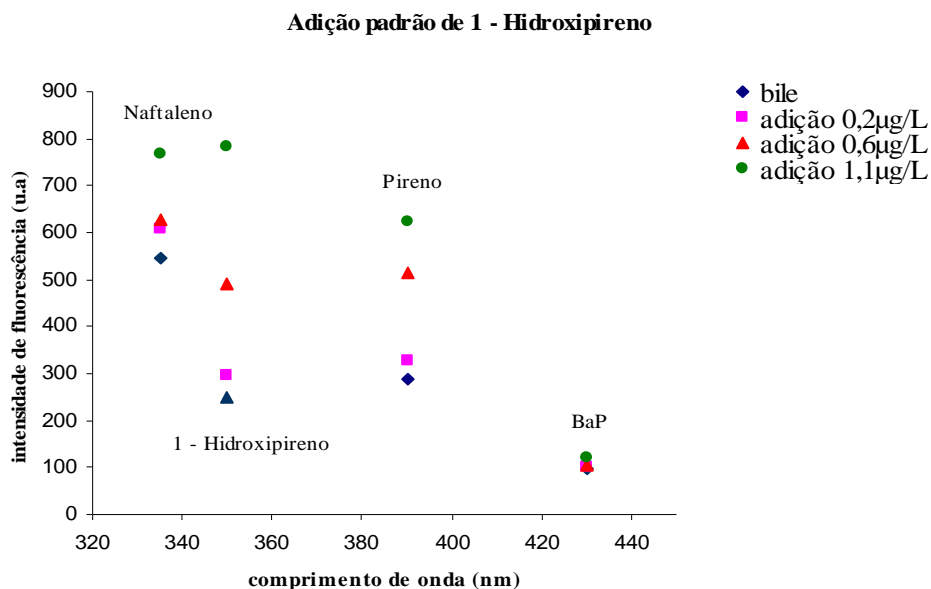


Figura 15D – Intensidades de fluorescência máxima obtidas pelas adições do padrão de Naftaleno sobre bile e leitura realizada nos $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335, 340/390, 380/430 nm através de FF e pelo modo SFS com $\Delta\lambda=37$ nm.

4.3 – Espectros das biles dos peixes por FF e SFS

A figura abaixo apresenta alguns espectros exemplificativos da fluorescência das biles medida em condições apropriadas para detecção dos metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxipireno.

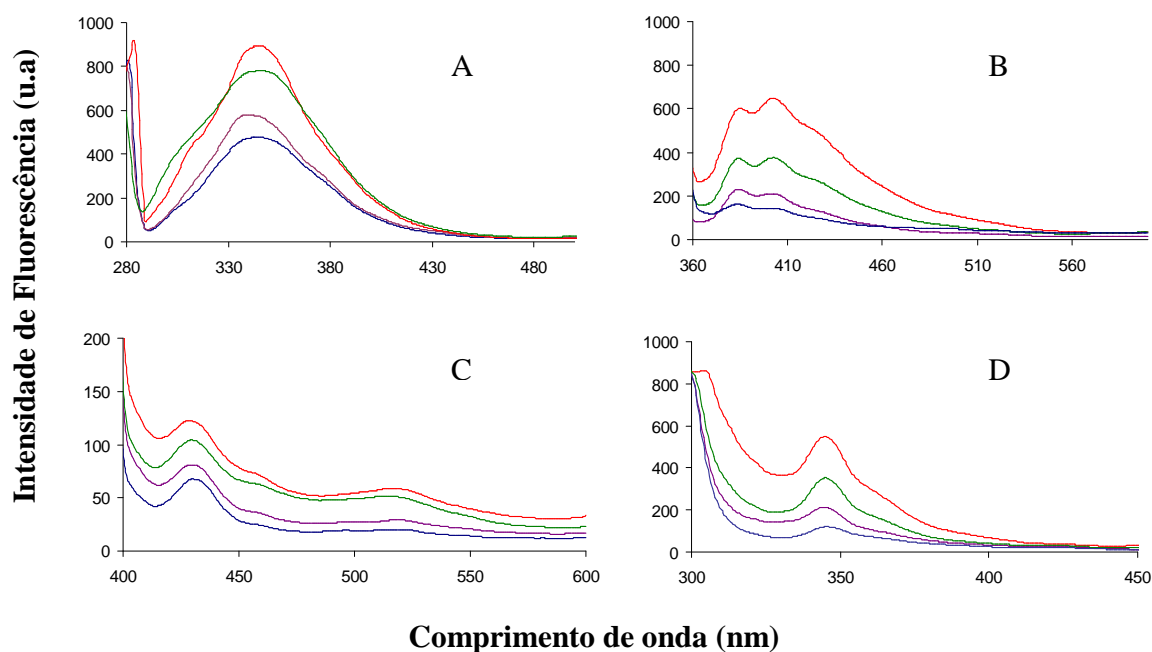


Figura 16 – Espectros de fluorescência de algumas biles de Corvinas da Baía de Guanabara e Itaipu. **A** – Biles determinadas por Fluorescência Fixa para metabólitos de Naftaleno ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 270/335 nm). **B** – Biles determinadas por Fluorescência Fixa para metabólitos de Pireno ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 340/390 nm). **C** – Biles determinadas por Fluorescência Fixa para metabólitos de Benzo(a)pireno ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 380/430 nm). **D** – Biles determinadas por Fluorescência Sincronizada para o 1-Hidroxi-pireno ($\Delta\lambda=37$ nm, λ_{em} 350 nm).

4.4 – Parâmetros biométricos e biológicos dos peixes

Foram coletados 173 Baiacus e 116 Corvinas nos meses de maio a dezembro de 2007 na BG e em Itaipu. Dos 173 Baiacus analisados, 92 foram capturados na BG e 81 em Itaipu. Em relação às Corvinas, 62 espécimes foram apanhados na BG e 54 em Itaipu.

Foi realizada a biometria dos peixes capturados e quanto às médias dos pesos e comprimentos analisados, observou-se que, para ambas as espécies, os exemplares coletados em Itaipu são em média maiores e mais pesados do que os coletados na BG, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Média do peso e comprimento com seu erro padrão, mínimo e máximo, de Baiacus e Corvinas coletados na BG e em Itaipu.

Espécie	Local	Peso (g)			Comprimento (cm)		
		Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo
Baiacu (total n= 173)	BG n= 92	110,6 ± 7,562 ^a	28,0	466,3	12,6 ± 0,247 ^c	8,4	22,3
	Itaipu n= 81	176,0 ± 7,647 ^a	24,5	367,3	14,7 ± 0,242 ^c	7,8	19,1
Corvina (total n=116)	BG n= 62	105,6 ± 26,212 ^b	16,5	1150,0	22,2 ± 0,986 ^d	12,8	47,5
	Itaipu n= 54	297,1 ± 16,344 ^b	113,1	559,4	30,0 ± 0,557 ^d	22,1	38,2

EP = Erro padrão da média; letras iguais sobrescritas denotam diferenças estatisticamente significativas (p-valor ≤ 0,05, teste T-Student)

Após a realização da biometria dos peixes, estes foram sexados e a tabela 4 apresenta o número de machos, fêmeas e imaturos (espécimes que não puderam ter o sexo determinado macroscopicamente) de Baiacus e Corvinas coletados na BG e em Itaipu. O número de Baiacus coletados na BG e em Itaipu, tanto de machos, fêmeas e imaturos foi bastante equilibrado, o que não foi observado para as Corvinas.

Tabela 4 – Número de Baiacus e Corvinas analisados por sexo e local de coleta.

Espécie	Local	Sexo	n
Baiacu	BG	macho	32
		fêmea	44
		imaturo	16
		Total	92
	Itaipu	macho	35
		fêmea	39
		imaturo	7
Total	81		
Corvina	BG	macho	36
		fêmea	19
		imaturo	7
		Total	62
	Itaipu	macho	19
		fêmea	33
		imaturo	2
Total	54		

n = número de amostras analisadas

4.5 – Biomarcadores utilizados na avaliação dos efeitos da contaminação por HPAs

4.5.1 – Fator de Condição (K)

O Fator de Condição (K) foi obtido através do cálculo da fórmula $K = \text{peso (g)} / \text{comprimento (cm)}^3$. O K calculado, para ambas as espécies, é menor, em média, na BG (Figura 17). Avaliando esta diferença através do Teste T-Student, pôde-se observar que estatisticamente há diferença significativa para este fator em relação às duas regiões estudadas para ambos os peixes. (p-valor $\leq 0,05$).

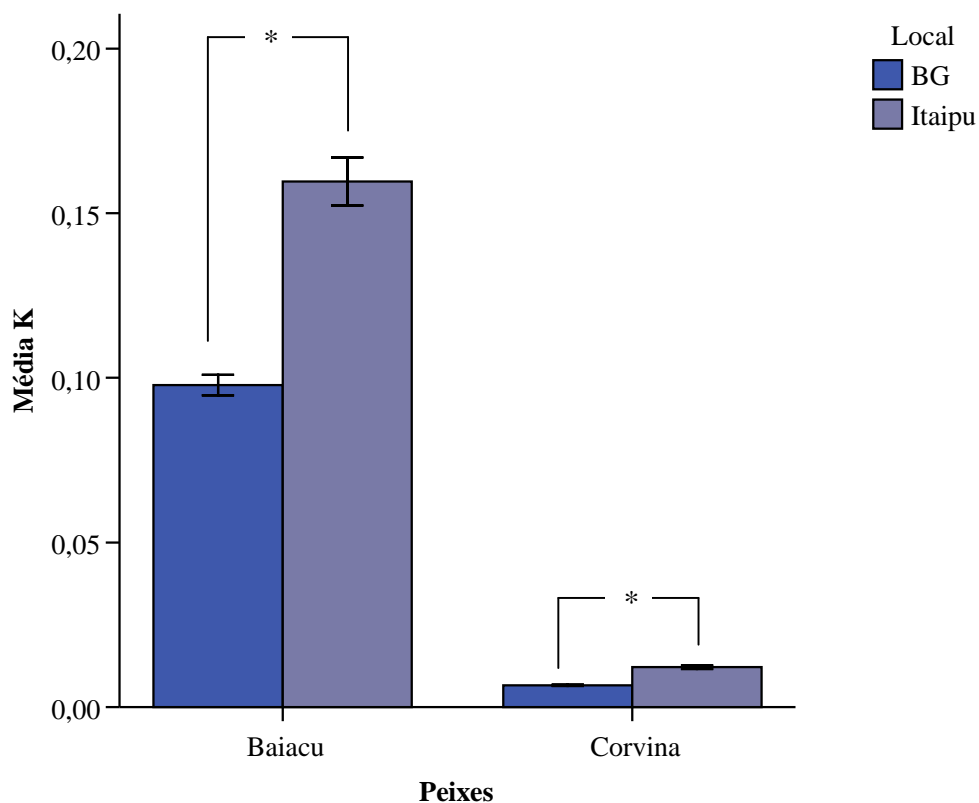


Figura 17 – Média do fator de condição com seu erro padrão (barras de erro sobre as colunas), para Baiacu e Corvina em ambas as regiões estudadas.

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

4.5.2 – Análises dos metabólitos de HPAs

Foram determinados os metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno além do 1-Hidroxipireno, nas biles de Baiacus e Corvinas, através dos métodos de FF e SFS. A partir dos resultados obtidos foram calculadas medidas de tendência central e de dispersão das concentrações destes metabólitos.

Das 289 amostras avaliadas para os metabólitos do tipo Naftaleno, foram descartados 11 resultados, pois as diluições seriadas necessárias para suas leituras foram superiores a 20.0000 vezes, o que tornou estas detreminações pouco confiáveis. Três análises foram descartadas na determinação do 1-Hidroxipireno por problemas operacionais do equipamento.

A tabela 5 apresenta os valores médios dos metabólitos de HPAs determinados em Baiacus e Corvinas da BG e Itaipu.

Os resultados mostraram que dos metabólitos de HPAs determinados nas biles de Baiacus, os do tipo Naftaleno apresentaram maior média de concentração na BG do que em Itaipu e a concentração do 1-Hidroxi pireno encontrada foi em média a mesma em ambas as regiões (0,05 µg/ml). Em relação à avaliação feita nas biles de Corvinas, para todos os quatro tipos de compostos em estudo, foram determinadas concentrações em média superiores na BG do que em Itaipu. Estes dados estão sombreados em cinza na tabela 5.

Tabela 5 – Média com seu erro padrão (EP), máximo e mínimo da concentração dos metabólitos de HPAs de Baiacus e Corvinas da BG e Itaipu.

Espécie	Local	Metabólitos do Naftaleno ($\mu\text{g/mL}$)			Metabólitos de Pireno ($\mu\text{g/mL}$)			Metabólitos do Benzo(a)pireno ($\mu\text{g/mL}$)			1 - Hidroxipireno ($\mu\text{g/mL}$)		
		Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo
Baiacu	BG	224,4 \pm 8,309	70,5	513,4	1,9 \pm 0,164	0,2	8,1	0,8 \pm 0,055	0,04	2,2	0,5 \pm 0,035	0,1	1,9
	Itaipu	196,4 \pm 8,805	54,7	488,7	2,1 \pm 0,224	0,2	8,2	0,9 \pm 0,079	0,01	2,7	0,5 \pm 0,047	0,1	1,8
Corvina	BG	361,7 \pm 31,177	75,0	1135,6	2,2 \pm 0,163	0,5	6,3	0,7 \pm 0,059	0,04	2,3	0,5 \pm 0,036	0,1	1,4
	Itaipu	343,1 \pm 24,258	129,8	913,7	1,5 \pm 0,187	0,6	10,4	0,6 \pm 0,061	0,01	2,0	0,4 \pm 0,048	0,1	2,7

EP = erro padrão da média

número de Baiacus analisados para os metabólitos de Naftaleno na BG= 90 e Itaipu= 80; para os metabólitos de Pireno e Benzo(a)pireno e o 1-Hidroxipireno, BG= 92 e Itaipu= 81.

número de Corvinas analisadas para os metabólitos de Naftaleno na BG= 57 e Itaipu= 51; para os metabólitos de Pireno e Benzo(a)pireno, BG=62 e Itaipu= 54 e para o 1-Hidroxipireno, BG= 59 e Itaipu= 54.

4.6 – Análise dos dados obtidos

Foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados obtidos na determinação dos metabólitos de HPAs. Para todos os metabólitos analisados não houve distribuição normal dos dados ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Desta forma, realizou-se a logaritimização dos dados que passaram a apresentar então distribuição normal. Foi possível assim avaliar os dados através de testes paramétricos.

4.6.1 – Análise da relação entre as concentrações dos metabólitos de HPAs biliares e parâmetros biológicos e biométricos

Foi analisada a influência do sexo dos peixes na determinação dos metabólitos de HPAs. Não foram incluídos os peixes considerados imaturos, evitando desta forma, uma análise enviesada, já que os imaturos se tornarão machos ou fêmeas quando adultos.

Em relação à Itaipu, não foi observada diferenças estatisticamente significativas (Teste T-Student; $p\text{-valor} \leq 0,05$) entre machos e fêmeas em relação às médias das concentrações dos metabólitos de HPAs em estudo. Este resultado foi observado tanto nas análises das biles de Baiacu como de Corvina. No que diz respeito à determinação dos HPAs da BG, observou-se diferença significativa entre machos e fêmeas de Corvina na análise do 1 – Hidroxipireno ($p\text{-valor} = 0,034$). Estes dados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Diferença entre machos e fêmeas de Baiacus e Corvinas na determinação dos metabólitos de HPAs, na BG e em Itaipu.

Espécie	Local	Diferenças entre machos e fêmeas	
			p-valor
Baiacu	BG	Metabólitos do Naftaleno	0,543
		Metabólitos de Pireno	0,261
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,334
		1 – Hidroxipireno	0,363
	Itaipu	Metabólitos do Naftaleno	0,359
		Metabólitos de Pireno	0,118
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,356
		1 – Hidroxipireno	0,167
Corvina	BG	Metabólitos do Naftaleno	0,483
		Metabólitos de Pireno	0,061
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,512
		1 – Hidroxipireno	0,034*
	Itaipu	Metabólitos do Naftaleno	0,399
		Metabólitos de Pireno	0,781
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,242
		1 – Hidroxipireno	0,413

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

Com intuito de avaliar influências dos parâmetros biométricos nas análises dos metabólitos de HPAs, foi avaliada a correlação entre a concentração dos metabólitos e o peso e comprimento dos peixes capturados.

Observou-se que na BG foram encontradas correlações, embora fracas, apenas entre os metabólitos de Pireno e o 1–Hidroxipireno e peso de Baiacus, e entre os metabólitos de Benzo(a)pireno e peso e comprimento de Baiacus. Os valores sombreados de cinza, apresentados na tabela 7, destacam estas correlações.

Tabela 7 – Valores de correlação de Pearson (r^2) e significâncias estatísticas dos comprimentos e pesos de Baiacus e Corvinas e os metabólitos de HPAs.

Espécie	Local		Comprimento (cm)		Peso (g)	
			r^2	p-valor	r^2	p-valor
Baiacu	BG	Metabólitos do Naftaleno	0,003	0,60	0,048	0,43
		Metabólitos de Pireno	0,026	0,13	0,046	0,04
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,071	0,01	0,089	0,00
		1 - Hidroxipireno	0,036	0,07	0,053	0,03
	Itaipu	Metabólitos do Naftaleno	0,001	0,79	0,007	0,46
		Metabólitos de Pireno	0,007	0,46	0,000	0,99
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,007	0,45	0,004	0,57
		1 - Hidroxipireno	0,007	0,44	0,000	0,95
Corvina	BG	Metabólitos do Naftaleno	0,063	0,06	0,017	0,33
		Metabólitos de Pireno	0,016	0,32	0,004	0,61
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,044	0,11	0,045	0,11
		1 - Hidroxipireno	0,005	0,61	0,002	0,73
	Itaipu	Metabólitos do Naftaleno	0,074	0,06	0,049	0,12
		Metabólitos de Pireno	0,234	0,09	0,258	0,06
		Metabólitos do Benzo(a)pireno	0,009	0,51	0,000	0,95
		1 - Hidroxipireno	0,027	0,24	0,039	0,15

4.6.2 – Efeitos do status alimentar

Foi observada a influência da normalização das concentrações dos metabólitos de HPAs através das proteínas biliares totais.

Foi obtida a razão entre os valores de concentração de cada metabólito de HPAs e a respectiva concentração de proteína para ambas as espécies de peixes estudadas. Cabe ressaltar que duas amostras de bile não possuíram volume suficiente para determinação de proteína e que, como a concentração de proteína foi calculada em $\mu\text{g/mL}$, a razão obtida é adimensional.

Como mencionado no item 4.5.2 as médias das concentrações dos metabólitos de HPAs observadas foi maior na BG do que em Itaipu, para as análises realizadas em

Corvinas. O que se pôde notar após a normalização destes dados pela proteína é que as médias das concentrações dos metabólitos mantiveram-se superiores na BG.

Para análises em Baiacus, antes da normalização (item 4.5.2) observou-se que a média da concentração dos metabólitos de Naftaleno era maior na BG do que em Itaipu. Após a normalização destes dados pela proteína, não se observa mais esta diferença, como mostra a tabela 8. Os dados sombreados de cinza, na referida tabela, destacam as médias das concentrações dos metabólitos de HPAs normalizadas em Corvina.

Tabela 8 – Média com seu erro padrão (EP), máximo e mínimo da concentração dos metabólitos de HPAs de Baiacus e Corvinas da BG e Itaipu normalizados pela proteína biliar.

Espécie	Local	Metabólitos do Naftaleno ($\mu\text{g/mL}$) ($\times 10^{-4}$)			Metabólitos de Pireno ($\mu\text{g/mL}$) ($\times 10^{-4}$)			Metabólitos do Benzo(a)pireno ($\mu\text{g/mL}$) ($\times 10^{-4}$)			1 - Hidroxipireno ($\mu\text{g/mL}$) ($\times 10^{-4}$)		
		Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo	Média + EP	Mínimo	Máximo
Baiacu	BG	104,1 \pm 5,81	27	377	1,19 \pm 0,18	0,06	13,82	0,44 \pm 0,06	0,010	4,53	0,28 \pm 0,04	0,03	2,74
	Itaipu	117,7 \pm 6,64	39	390	1,45 \pm 0,20	0,11	9,31	0,57 \pm 0,07	0,007	2,80	0,33 \pm 0,04	0,05	2,11
Corvina	BG	173,7 \pm 20,99	47	874	2,28 \pm 0,61	0,11	28,50	0,65 \pm 0,16	0,010	7,21	0,40 \pm 0,10	0,03	5,11
	Itaipu	124,0 \pm 5,280	47	264	0,66 \pm 0,12	0,14	6,24	0,22 \pm 0,03	0,004	0,98	0,17 \pm 0,03	0,04	1,65

EP = erro padrão da média

número de Baiacus analisados para os metabólitos de Naftaleno na BG= 90 e Itaipu= 80; para os metabólitos de Pireno e Benzo(a)pireno e 1 - Hidroxipireno, BG= 92 e Itaipu= 81.

número de Corvinas analisadas para os metabólitos de Naftaleno na BG= 55 e Itaipu= 51; para os metabólitos de Pireno e Benzo(a)pireno, BG=60 e Itaipu= 54 e para o 1 - Hidroxipireno, BG= 57 e Itaipu= 54.

Para avaliar se a normalização pela proteína reduziu os efeitos do status alimentar dos peixes foi calculado o coeficiente de variação de cada metabólito de HPA, determinado antes e após a normalização pela proteína. Os resultados, indicados na tabela 9, mostram que a porcentagem do coeficiente de variação é alta e a normalização pela proteína causou um incremento ainda maior na variação dos dados. Exceção a esta análise foi observada apenas para os metabólitos do Naftaleno determinados nas Corvinas de Itaipu. Estes valores estão sombreados de cinza na tabela 9.

Tabela 9 – Coeficientes de Variação (CV) da concentração dos quatro tipos de metabólitos de HPAs em estudo, antes e após normalização pela proteína.

Espécie	Local	CV (%) não normalizado				CV (%) normalizado			
		Met. Naftaleno	Met. Pireno	Met. Benzo(a) pireno	1-Hidroxi Pireno	Met. Naftaleno	Met. Pireno	Met. Benzo(a) pireno	1-Hidroxi pireno
Baiacu	BG	35	82	69	72	53	150	131	132
	Itaipu	40	95	83	85	51	126	109	117
Corvina	BG	65	57	65	54	90	207	194	206
	Itaipu	50	90	81	90	30	130	95	132

Met. = Metabólitos

4.6.3 – Avaliação da diferença entre BG e Itaipu em relação às concentrações dos metabólitos de HPAs biliares antes e após a normalização pela proteína

Foi avaliado se havia diferença estatisticamente significativa das concentrações dos metabólitos de HPAs entre a BG e Itaipu, em ambas as espécies de peixe em estudo, antes e após a normalização dos dados pelas proteínas biliares.

Os dados não normalizados, para o Baiacu, mostraram diferença estatisticamente significativa entre BG e Itaipu quanto à concentração dos metabólitos do tipo Naftaleno (p -valor = 0,015). O resultado pode ser observado na figura 18.

Em relação às Corvinas, como apresentado na tabela 5, as concentrações de todos os metabólitos analisados são em média maiores na BG do que em Itaipu. Adicionalmente, pôde-se observar diferenças estatisticamente significativas entre BG e Itaipu em relação às médias das concentrações dos metabólitos do tipo Pireno, Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxi pireno (p-valor = 0,000; 0,020; 0,003 respectivamente para os metabólitos do Pireno, Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxi pireno). A figura 19 apresentam estes resultados.

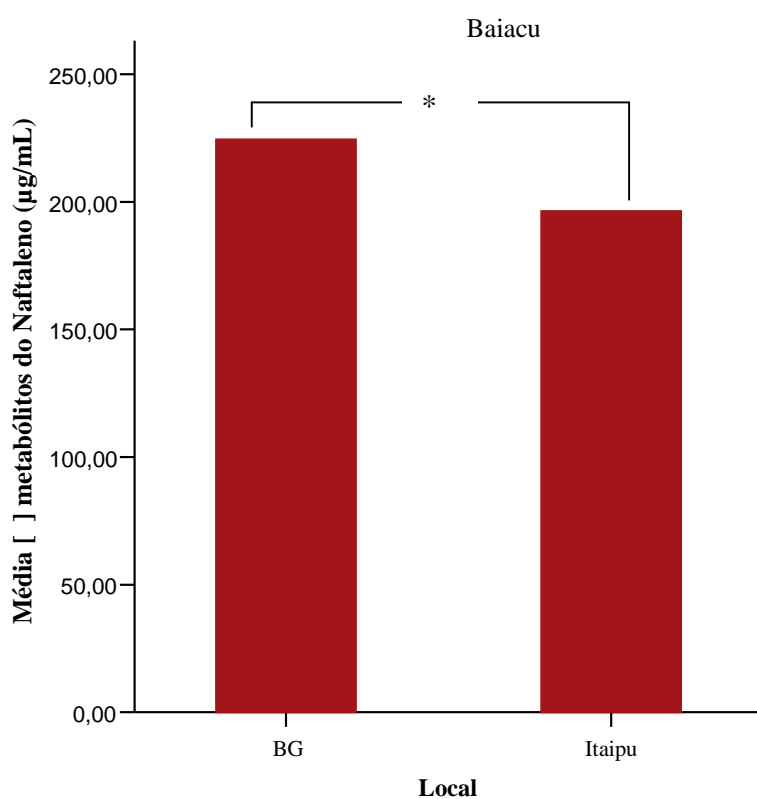


Figura 18 – Média da concentração dos metabólitos do Naftaleno analisados em Baiacu da BG e Itaipu.

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

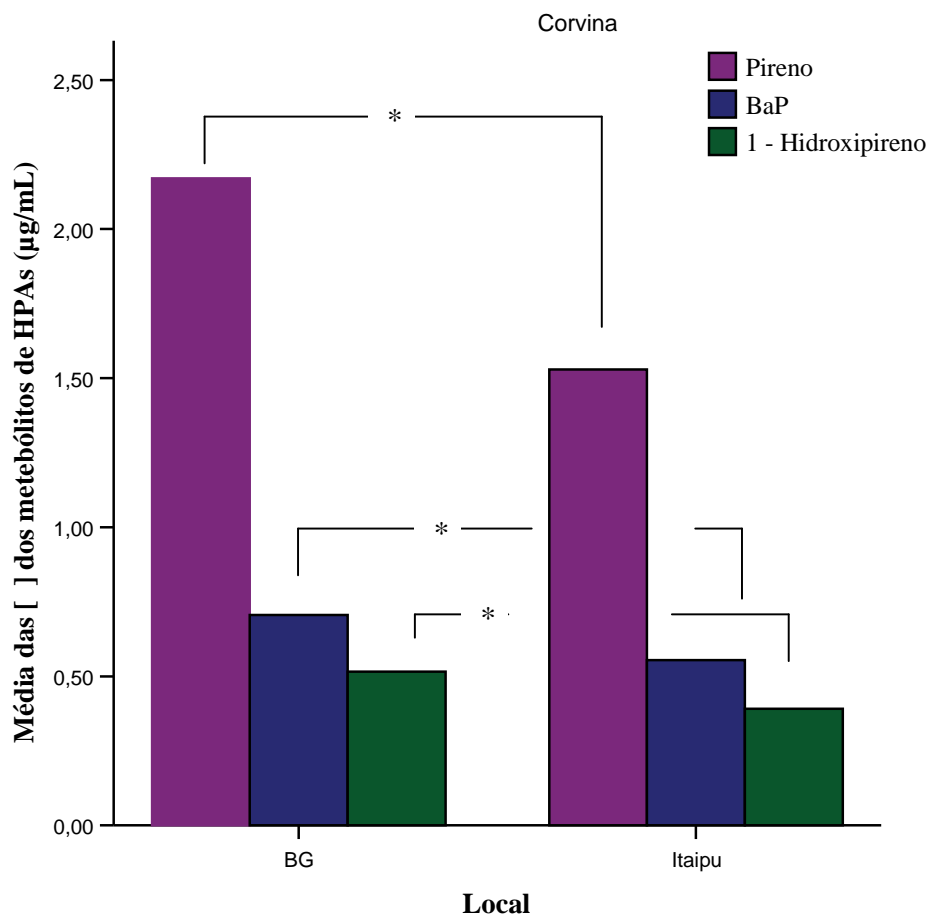


Figura 19 – Média das concentrações dos metabólitos de Pireno, Benzo(a)pireno e do 1-Hidroxi-pireno analisados em Corvina da BG e Itaipu.

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

Após a normalização dos dados pela proteína pôde-se observar que para o Baiacu não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (p valor $\leq 0,05$) entre BG e Itaipu para nenhum dos metabólitos em estudo. No entanto, antes da normalização tinha-se observado diferença estatisticamente significativa entre BG e Itaipu quanto à concentração dos metabólitos do tipo Naftaleno (p-valor = 0,015).

Na avaliação feita em Corvina, após a normalização pela proteína, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os quatro metabólitos avaliados (p valor = 0,025; 0,012; 0,015; 0,042 para os metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e para o 1-Hidroxi-pireno, respectivamente). Estes dados estão apresentados na figuras 20A e 20B.

Novamente, comparando com os dados obtidos antes da normalização pela proteína, na análise realizada em Corvina não se havia observado diferença significativa entre BG e Itaipu quanto à concentração dos metabólitos do Naftaleno.

Desta forma observou-se que quando se comparou BG e Itaipu em relação aos metabólitos de HPAs foram obtidos resultados diferentes antes e após a normalização pela proteína.

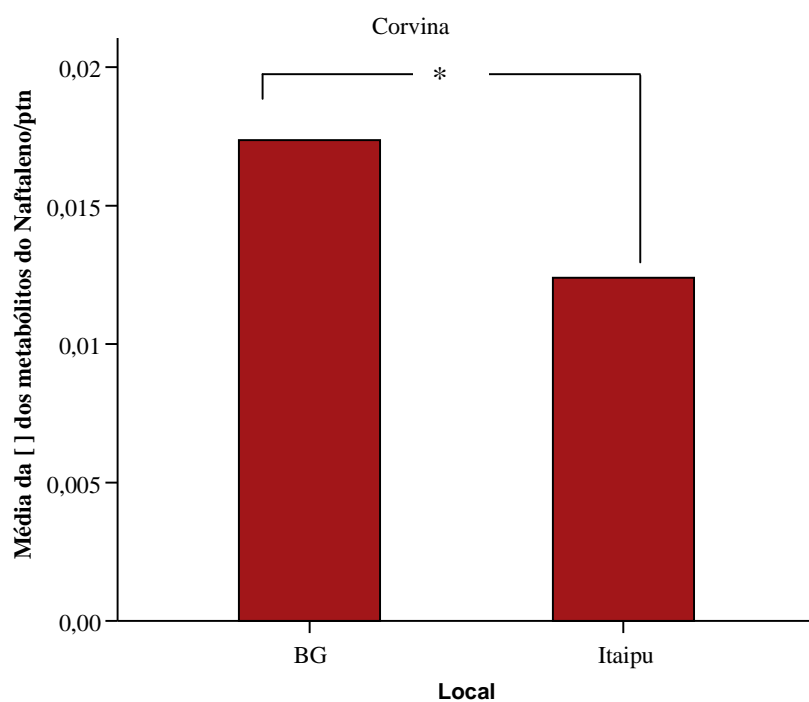


Figura 20A – Média da concentração dos metabólitos do Naftaleno analisados em Corvina da BG e Itaipu após normalização pela proteína.

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

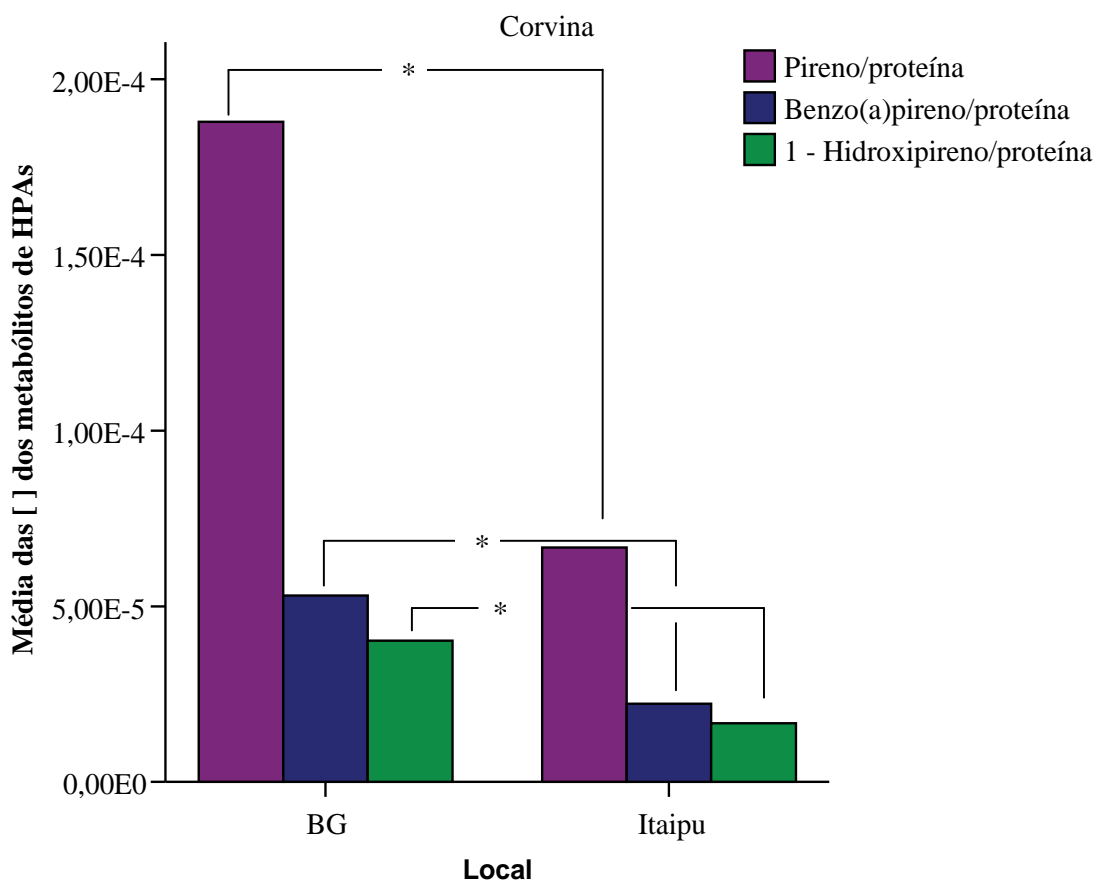


Figura 20B – Média das concentrações dos metabólitos de Pireno, Benzo(a)pireno e do 1-Hidroxipireno analisados em Corvina da BG e Itaipu após normalização pela proteína.

* representa diferenças estatisticamente significativas (Teste T- Student; p valor $\leq 0,05$)

5 – DISCUSSÃO

Os ecossistemas aquáticos e conseqüentemente sua biota vêm sendo ameaçados, de forma crescente, pela presença de HPAs oriundos de fontes urbanas e industriais. Alguns destes compostos podem ser carcinogênicos, mutagênicos ou genotóxicos e por esta razão nos Estados Unidos sua Agência de Proteção Ambiental (EPA) prioriza o monitoramento de 16 destes HPAs, dentre os quais se encontram o Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno ⁴⁴.

Devido às suas características de hidrofobicidade, estes compostos podem estar concentrados nos sedimentos a níveis mil vezes maiores do que na coluna d'água, causando especial impacto aos organismos bentônicos e demersais ⁶⁰.

Dentro deste contexto, é sabido que os peixes são particularmente vulneráveis a contaminação por HPAs. O habitat aquático destes organismos é naturalmente próximo dos habitats humanos e conseqüentemente às fontes potenciais de contaminação por HPAs. Os peixes são particularmente vulneráveis à exposição e susceptíveis a alguns efeitos adversos como tumores e lesões. Devido ao seu papel central na cadeia alimentar, e também sua importância comercial, os peixes e os efeitos causados pelos HPAs nestes organismos vêm sendo objeto de contínuos estudos ²⁸.

É importante salientar que, os HPAs não se bioacumulam por longos períodos de tempo em peixes, nem são biomagnificados na cadeia trófica, pois estes organismos são capazes de metabolizar estes compostos ⁴². Entretanto, é sabido que durante esta metabolização podem ser formados intermediários reativos potencialmente danosos que podem causar efeitos adversos graves. Estes efeitos podem levar a mudanças em populações de peixes podendo atingir outras populações que dependam destas espécies como fonte de alimento. Os efeitos indiretos da contaminação de peixes vêm sendo estudados e dentre as conseqüências já observadas pode-se citar a competição entre espécies por alimento e efeitos tróficos em cascata. Desta forma, essas alterações podem, em última instância, afetar ao homem ²⁸.

Diante disso, avaliações destes ambientes aquáticos mostram se cada vez mais fundamentais. Para o estabelecimento da condição homeostática destes ambientes naturais é necessário que seja realizado monitoramento destas áreas o que possibilitaria a tomada de ações corretivas ⁵⁴.

Entretanto, o monitoramento e a avaliação do risco dos ambientes impactados não podem ser baseados exclusivamente em análises químicas de amostras ambientais, pois estas análises não refletem os efeitos deletérios causados por contaminantes na

biota, não sendo, então, apropriadas na indicação e predição do impacto que estas substâncias podem causar nos organismos aquáticos^{49, 55}. Desta forma, para avaliar os impactos dos HPAs na qualidade ambiental é pertinente que sejam usados biomarcadores, ferramentas capazes de medir os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos destes ecossistemas⁵⁰.

A determinação da fluorescência biliar dos HPAs pelos métodos de FF e SFS são, sem dúvida, apropriadas para estudos de monitoramento da qualidade da biota aquática. Estas metodologias são simples, o que possibilita a avaliação de grande número de amostras e conseqüente monitoramento durante longos períodos de tempo. Adicionalmente, possuem baixo custo, alta reprodutibilidade e sensibilidade suficiente para distinguir entre áreas com diferentes graus de contaminação²⁶.

5.1 – Considerações gerais sobre os aspectos analíticos utilizados para determinação de HPAs

5.1.1 – Determinação dos comprimentos de onda para determinação de HPAs

A determinação dos pares de comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) para avaliação dos metabólitos de HPAs pelo método de fluorescência fixa (FF), assim com a escolha do $\Delta\lambda$ utilizado na espectroscopia de fluorescência sincronizada (SFS) é uma etapa fundamental para implementação e otimização do método de determinação de metabólitos de HPAs. Estes parâmetros embora sejam características inerentes dos compostos em estudo podem variar de acordo com as propriedades do equipamento utilizado e das condições analíticas empregadas.

Os pares de comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) obtidos neste estudo, através do método de FF, para avaliação de metabólitos do tipo Naftaleno (270/335 nm), Pireno (340/390 nm) e Benzo(a)pireno (380/430 nm), são bastante semelhantes aos comprimentos utilizados em outros trabalhos de monitoramento ambiental, que utilizam esta mesma técnica (290/335 nm, 341/383 nm e 380/430 nm, respectivamente para os metabólitos biliares do Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno)^{30, 43, 58}.

Da mesma forma, a escolha do $\Delta\lambda$ de 37 nm para a determinação do 1-Hidroxipireno por SFS corrobora com os dados obtidos na literatura. Ariese e colaboradores (1993)⁸³ observaram, em um trabalho utilizando linguados (*Platichthys flesus*) mantidos em contato com sedimento contaminados por HPAs, que através do

escaneamento dos monocromadores de forma simultânea com diferença constante de comprimento de onda de 37 nm ($\Delta\lambda = 37$ nm) de um espectrofluorímetro foi possível determinar os espectros de fluorescência sincronizada do 1-Hidroxipireno.

Desta forma, a análise realizada para escolha dos melhores pares de comprimentos de onda e $\Delta\lambda$ foi fundamental para a adequação destes dois métodos (FF e SFS) às condições laboratoriais desenvolvidas no Laboratório de Ecotoxicologia do CESTEHE.

5.1.2 – Curvas padrão

Foram feitas curvas padrão de Naftaleno, Pireno Benzo(a)pireno e 1-Hidroxipireno, ainda em função de ajustar os parâmetros analíticos para determinação dos metabólitos de HPAs na bile dos peixes. A partir das concentrações destas curvas e correspondentes intensidades de fluorescência foram obtidas equações lineares da reta ($y=ax+b$) para os quatro compostos em estudo. Para todas as equações da reta geradas foram alcançados coeficientes de correlação (r^2) satisfatórios ($> 0,99$), demonstrando linearidade para a faixa de leitura utilizada. Estas curvas foram empregadas posteriormente para transformar os valores de Intensidade de Fluorescência medidos em concentração de metabólitos de HPAs biliares expressa em equivalentes do seu respectivo HPA de origem.

5.1.3 – Avaliação do efeito de adição padrão

5.1.3.1 – Adição de padrão em biles

A partir dos resultados obtidos na avaliação dos efeitos de adição padrão, descritos nos Resultados, item 4.2.1, foi possível observar que os comprimentos de onda de excitação e análise escolhidos para a determinação HPAs em estudo são ideais na determinação dos metabólitos de HPAs nas biles dos peixes capturados (270/335, 340/390, 380/430 nm para o Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno respectivamente, medidos por FF; $\lambda_{em} = 350$ nm e $\Delta\lambda = 37$ nm para o 1-Hidroxipireno medido por SFS). Isto pôde ser averiguado, pois ao analisar os espectros de fluorescência da bile vê-se que não há deslocamento destes espectros, estando os picos de fluorescência biliar nos mesmos sítios que os picos de fluorescência obtidos pelos padrões de HPAs.

5.1.3.2 – Avaliação da especificidade dos comprimentos de onda

A partir dos resultados obtidos na avaliação da especificidade dos comprimentos de onda usados (interferência provocada pela presença dos outros metabolitos de HPA na fluorescência de cada um dos HPAs em estudo), descritos nos Resultados, item 4.2.2, foi possível observar que as adições de Naftaleno, Pireno e Benzo(a)pireno não provocaram qualquer interferência nas leituras dos outros metabolitos. Este fato pode facilmente ser entendido observando os espectros de excitação e de fluorescência de cada um dos HPAs em estudo (item 4.1.1) e observando que, normalmente, ao comprimento de onda de excitação usado para cada um dos HPAs em estudo a absorção dos outros HPAs não é significativa. A única exceção ao dito é o caso do Naftaleno. De fato, nos resultados apresentados no item 4.2.2 é possível observar que tanto a adição de Pireno quanto a adição de Benzo(a)pireno provocam um pequeno aumento da fluorescência do Naftaleno. Este fato que é possível porque tanto o Pireno quanto o Benzo(a)pireno apresentam alguma absorção no comprimento de onda de excitação do Naftaleno.

Já no caso da adição do padrão de 1-Hidroxipireno pôde-se notar que houve não só o esperado aumento da fluorescência do 1-Hidroxipireno, como também da fluorescência do Pireno e do Naftaleno. Os espectros apresentados no item 4.1.1 para os dois compostos confirmam isso. O caso do aumento da fluorescência do Pireno devido à adição de 1-Hidroxipireno pode ser facilmente compreensível se pensarmos que as condições escolhidas para a excitação/análise do Pireno são condições ideais para a análise não só de Pireno como também de todos os seus metabolitos, e que o 1-Hidroxipireno é precisamente um deles. Já o fato da adição de Pireno não provocar aumento significativo na fluorescência do 1-Hidroxipireno vem apenas ressaltar a robustez e adequação da técnica de SFS para a determinação do principal metabolito do pireno. O caso do aumento da fluorescência do Naftaleno devido à adição de 1-Hidroxipireno tornou-se bastante fácil de entender, ao verificar que o espectro de absorção do 1-Hidroxipireno além de uma banda entre 300 e 400 nm tem outras bandas de absorção a menores comprimentos de onda, inclusive uma dessas bandas tem máximo a 270 nm⁸⁵ i.e., ao comprimento de onda de excitação do Naftaleno.

5.2 – Considerações gerais sobre a determinação de HPAs em bile

Após os ajustes dos parâmetros analíticos adequados às condições laboratoriais passou-se a determinação dos metabólitos de HPAs nas biles dos peixes coletados.

Amostras de bile de peixes expostos a HPAs geralmente são uma mistura complexa de metabólitos desta classe de compostos. Muitos destes metabólitos possuem significativo grau de similaridade de suas propriedades de fluorescência. Desta forma, foi avaliada a capacidade das metodologias de FF e SFS de distinguir entre os diferentes metabólitos de HPAs.

Embora possa haver alguma sobreposição dos espectros de fluorescências dos HPAs, através dos métodos de FF e SFS utilizados neste estudo foi possível determinar a fluorescência biliar dos metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e 1-Hidroxi-pireno. Estes espectros foram apresentados nos Resultados no item 4.3.

Cabe ressaltar que como diferentes HPAs e seus metabólitos podem contribuir para fluorescência em um mesmo comprimento de onda, uma quantificação absoluta de cada um dos metabólitos não é possível utilizando os métodos descritos. Desta forma, a concentração dos metabólitos é considerada semi-quantitativa e é dada em equivalentes de cada um dos HPAs⁵⁸.

Por outro lado, o método de FF possui acurácia e em outros estudos mostrou-se eficiente em avaliar a exposição de peixes a diferentes metabólitos de HPAs. Como demonstrado por Ariese (1993)⁸³ existe boa correlação entre o 1-Hidroxi-pireno medido em biles através do método de SFS e por cromatografia líquida de alta performance com detector de fluorescência (HPLC-F), método este mais específico.

Da mesma forma, Lin (1996)³⁰, mostrou que os metabólitos de Naftaleno e Benzo(a)pireno podiam ser determinados através do método de FF com boa acurácia. Assim como Ariese (1993)⁸³, Lin (1996)³⁰ comparou o método de FF com a HPLC-F chegando a conclusão de que havia correlação satisfatórias entre as metodologias citadas.

Em nosso trabalho, como já mencionado foi possível distinguir entre os diferentes metabólitos de HPAs em estudo e determinar de forma semi-quantitativa suas concentrações.

Os resultados obtidos são condizentes com outros estudos que visavam avaliar a exposição de peixes contaminados por HPAs através do uso das mesmas metodologias empregadas neste trabalho^{43, 58, 83}.

5.3 – Análises biológicas e biométricas dos peixes e possíveis influências na determinação dos HPAs nas biles

Biomarcadores são ferramentas extremamente úteis porque integram um vasto leque de fatores ambientais, toxicológicos e ecológicos na avaliação dos efeitos da contaminação ambiental. Entretanto, a implementação bem sucedida de biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental exige uma boa compreensão dos mecanismos subjacentes às respostas. Os mesmos atributos que fazem dos biomarcadores boas ferramentas para monitoramentos biológicos também devem ser acompanhados com precaução evitando sua aplicação indiscriminada⁵³.

Muitas variáveis não relacionadas com a poluição podem ter um impacto adicional sobre os diferentes sistemas biológicos e, portanto, podem interferir com as repostas dos biomarcadores, se as condições experimentais não são minuciosamente analisadas ou controladas. Estas variáveis não relacionadas à poluição mas que podem causar interferências na resposta dos biomarcadores podem ser chamadas de fatores de confundimento. Exemplos de tais fatores são o sexo e tamanho (idade) dos organismos escolhidos para avaliação⁵³.

Entretanto, a maioria dos dados disponíveis de toxicidade das substâncias químicas, raramente, leva em consideração a possível influência dos fatores de confundimento, fatores estes que sempre serão variáveis em trabalhos de campo⁵³.

Parâmetros como sexo e tamanho dos peixes devem, sem dúvida, ser observados na avaliação de suas possíveis influências na determinação dos metabólitos de HPAs em biles de peixes através dos métodos de fluorescência. Entretanto, muitos autores não vêm encontrando correlação entre estas variáveis. Fuentes-Rio e colaboradores (2005)⁵¹, por exemplo, não observaram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,005$) entre machos e fêmeas na determinação dos metabólitos de HPAs, em estudo desenvolvido em três ambientes aquáticos no Chile. Da mesma forma, Yang & Bauman (2006)⁴⁸ observaram que as concentrações de metabólitos de HPAs em bile de peixes não possuíam correlação com sexo e idade destes organismos. Diante disso, estes autores sugeriram que a análise dos metabólitos biliares de HPAs é uma ferramenta robusta, não sendo influenciada por estes fatores não relacionados à contaminação.

No entanto, outros autores como Vives e colaboradores (2004)⁸⁶ e Vuorinen e colaboradores (2006)²³, encontraram diferenças entre machos e fêmeas na determinação dos metabólitos de HPAs, assim como, alguma correlação entre os tamanhos dos peixes e a concentração dos metabólitos biliares de HPAs. Porém, em ambos os trabalhos

citados, estes dados não foram muito conclusivos, uma vez que na maioria dos casos a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa. No caso do trabalho desenvolvido por Vuorinen (2006)²³, em algumas das áreas estudadas pôde-se perceber que os machos possuíam maiores concentrações de metabólitos de HPAs, mas este perfil não foi observado para todas as áreas em estudo, ocorrendo ainda, regiões onde as fêmeas possuíam as maiores concentração de metabólitos destes compostos.

De fato, os HPAs são metabolizados pelas enzimas do complexo citocromo P-450. Estas enzimas vêm sendo estudas e parecem ser influenciadas por fatores biológicos, como estado de desenvolvimento dos organismos e hormônios sexuais como o estrogênio²³.

Entretanto, no presente estudo, os dados relacionados ao sexo e a idade dos peixes não foram determinantes, indo de acordo com os resultados encontrados comumente na literatura. Aparentemente, devido à baixa correlação encontrada entre tamanho dos peixes e concentração dos metabólitos de HPAs, este fator biométrico não influenciou a determinação realizada e por este motivo não houve necessidade de estratificação dos grupos por faixas de tamanho. Da mesma forma, no que diz respeito ao sexo foi observado apenas diferença entre machos e fêmeas de Corvinas na determinação de um dos metabólitos de HPAs, no caso o 1-Hidroxi pireno. Diante disso, o grupo foi analisado como um todo, sem que fosse feita divisão entre os sexos para avaliar diferenças entre as áreas de estudo.

5.4 – Efeitos da condição alimentar

Este trabalho também avaliou o efeito do status alimentar dos peixes em relação à determinação dos metabólitos de HPAs biliares. Para tanto, foi comparada a dispersão das concentrações dos metabólitos de HPAs obtidas através do cálculo dos coeficientes de variação de cada metabólito, antes e após a normalização pela proteína. No item a seguir (5.5.2) será discutida a influência da normalização pelas proteínas na comparação da BG e Itaipu em relação à determinação das concentrações dos metabólitos de HPAs nas biles de Corvina e Baiacu.

Collier & Varanasi (1991)⁴¹ verificaram que durante períodos de jejum os níveis de proteína na bile aumentavam assim como a fluorescência dos HPAs e, desta forma, estas medidas podiam ser usadas para normalizar os dados, diminuindo erros de avaliação.

Entretanto, diferenças interindividuais na captação dos HPAs pelos peixes, tais como, tipo e quantidade de alimento consumido, tempo de contato com sedimento ou ingestão de partículas, podem contribuir para a dispersão dos dados, o que não pode ser corrigido através de normalização pela proteína (Ariese, 1997)⁷⁵. Desta forma, a normalização pela proteína ao invés de homogeneizar os dados poderia ser mais um fator de confundimento.

Dentro deste contexto, foi avaliado por Richardson e colaboradores (2004)⁸⁷ que a normalização dos dados poderia aumentar a variação dos resultados obtidos. Da mesma forma, Aas e colaboradores (2000)⁵⁸ observaram aumento da variação dos dados após normalização. Silva e colaboradores (2006)²⁴ realizaram um estudo de avaliação da exposição de HPAs em diversas espécies de peixes, entre elas, uma da mesma família do Baiacu de Espinho, utilizada no presente estudo. Os autores deste trabalho puderam concluir que não foi possível encontrar correlação significativa ($r^2=0,038$, $p=0,62$) entre metabólitos totais de HPA e proteínas totais biliares para espécie de Baiacu (*Cylichthys spinosus*) estudada.

Estes resultados são consonantes com o presente estudo, onde se observou aumento da variação dos dados após normalização pela proteína (ver tabela 7). Apenas para os metabólitos de Naftaleno determinados em Corvinas de Itaipu houve diminuição do coeficiente de variação.

De qualquer forma, embora diversos autores recomendem a normalização dos dados, especialmente em estudos de monitoramento, preconizam a apresentação dos dados tanto de forma não normalizada quanto normalizada^{43, 87}, como apresentado no presente estudo.

5.5 – O uso de biomarcadores para avaliação dos efeitos da contaminação de HPAs em peixes

5.5.1 – Fator de condição (K)

Neste trabalho foi utilizado o Fator de Condição (K) como biomarcador geral do estado de saúde dos peixes. Os resultados encontrados mostraram que tanto para Corvina como para Baiacu o Fator de Condição na Baía de Guanabara é, em média, menor, em média, do que em Itaipu (item 4.5.1). Estatisticamente esta diferença é significativa ($p \leq 0,05$), evidenciando uma pior qualidade de saúde dos peixes na BG, ambiente sabidamente poluído.

Estes resultados vão de acordo com outros estudos, que observaram Fatores de Condição menores em ambientes contaminados em relação a áreas controle^{43, 53}. Como o Fator de Condição é considerado um índice geral do estado nutricional dos peixes e conseqüentemente da saúde destes organismos, evidencia a diferença da qualidade de saúde dos organismos de duas áreas⁵³, como a observada no presente estudo.

5.5.2 – Determinação dos metabólitos de HPAs em bile de Corvina e Baiacu e normalização destes dados pela proteína biliar

Como biomarcador específico da contaminação por HPAs em peixes foi utilizada a determinação de metabólitos biliares destes compostos. Os metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e o 1-Hidroxi-pireno vêm sendo usado em diversos estudos de avaliação da exposição a HPAs em peixes. O monitoramento ambiental que utilize estes metabólitos inclui os mais freqüentes e priorizados HPAs associados a contaminação ambiental⁵⁸.

No tocante ao trabalho desenvolvido, pôde-se observar que através da análise realizada nas biles de Corvina, a Baía de Guanabara apresentou maior concentração de cada um destes metabólitos em comparação com Itaipu. Esta diferença foi estatisticamente significativa para todos os HPAs em estudo, exceto para o Naftaleno.

Em contrapartida, para as análises realizadas em Baiacu pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre Baía de Guanabara e Itaipu somente em relação aos metabólitos de Naftaleno. Esta espécie de peixe não se mostrou muito sensível a diferenças entre as áreas estudadas no que diz respeito aos metabólitos de HPAs de origem pirogênica. Entretanto foi capaz de distinguir entre as áreas para o HPA derivado do petróleo.

Estes resultados apontam para o fato de que existem diferenças fisiológicas e da responsividade de distintas espécies a poluição ambiental⁵³. Por esse motivo, o uso de mais de uma espécie bioindicadora na avaliação da contaminação de ambientes aquáticos foi de extrema importância, uma vez que as duas espécies em estudo responderam de forma distinta a exposição aos HPAs.

Além disso, muitos estudos utilizam apenas a determinação do 1-Hidroxi-pireno para avaliar a exposição de organismos aquáticos a HPAs^{34, 83}. No presente estudo foi avaliada a exposição aos metabólitos do Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno além do 1-Hidroxi-pireno. Desta forma, estes dados trazem novas respostas que precisam ser avaliadas com cautela permitindo sua correta interpretação.

Diante disso, avaliou-se a exposição aos peixes após a normalização dos dados de determinação de HPAs pelas proteínas biliares. Pôde-se perceber que, após a normalização dos dados referentes à análise em Corvina, a comparação feita entre BG e Itaipu mostrou diferenças significativas para todos os metabólitos em estudo. Entretanto, para análises em Baiacu, a comparação entre as duas áreas não mostrou diferenças significativas para nenhum dos metabólitos em questão.

Desta forma, pôde-se inferir que devem sempre ser feitas avaliações com mais de uma espécie bioindicadora, principalmente se não existirem dados progressos sobre estas espécies. Além disso, deve-se, como já dito avaliar os possíveis fatores de confundimento e avaliar os dados antes e após a normalização pela proteína.

No que diz respeito ao uso dos metabólitos de HPAs para avaliação da exposição dos organismos aquáticos da BG, este biomarcador demonstrou-se bastante eficiente para este tipo de estudo.

Através do uso deste biomarcador foi possível distinguir entre o nível de exposição dos peixes da BG e de Itaipu. Deve ser ressaltada a importância deste resultado, pois embora Itaipu tenha sido escolhida como área controle, esta região está localizada próxima a Baía de Guanabara. É considerada, por alguns autores como Amador (1997)⁸⁸, como formadora do arco de limite externo da Baía de Guanabara, ou seja, esta região pode ser vista como pertencente à BG. Desta forma, sofre influências hidrodinâmicas deste estuário ⁸⁹ o que, de certa forma, poderia dificultar a avaliação dos níveis de exposição dos espécimes capturados nestas duas áreas. Entretanto, este biomarcador específico da exposição à HPAs foi capaz de diferenciar entre o nível de exposição de Baiacu e Corvina da Baía de Guanabara e de Itaipu.

5.6 – Escolha da espécie sentinela para avaliação da exposição a HPAs

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de peixes, Corvina e Baiacu, e a partir de suas biles foram determinadas as concentrações dos metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno além do 1-Hidroxipireno.

A observação dos resultados obtidos mostrou que a Corvina apresenta-se como espécie ideal para avaliação dos efeitos da contaminação por HPAs, pois foi capaz de diferenciar BG de Itaipu para os todos os metabólitos em estudo. As Corvinas em comparação aos Baiacus mostraram-se mais sensíveis aos efeitos da contaminação por

HPAs, possibilitando seu uso em estudos que visem comparar áreas com distintos níveis de poluição.

Ademais, a Corvina pôde ser facilmente capturada em distintas épocas do ano, nas duas áreas de estudo, o que demonstra sua ampla distribuição geográfica e abundância.

Além dos fatores mencionados, a Corvina possui grande importância comercial, sendo uma das espécies mais consumidas no Brasil. Em relação ao estado do Rio de Janeiro, sua produção em média, considerando todo período de dados compreendido entre 1990-1999, situa-se em torno de 1.700 t anuais⁶².

Entretanto, deve ser ressaltado que a extração da bile das Corvinas mostrou-se como uma tarefa minuciosa. Esta espécie apresenta a vesícula biliar filiforme e os peixes de menor tamanho, muitas vezes não possuíam volume biliar suficiente para a análise. Desta forma, ao trabalhar com a Corvina é ideal que sejam escolhidos espécimes com comprimento de médio a grande.

Cabe ressaltar que a avaliação de metabólitos biliares de HPAs em Corvina nunca tinha sido realizada anteriormente, apesar de sua grande importância e características apropriadas. Com base nos dados obtidos e no mencionado acima, o uso da Corvina como espécie sentinela mostrou-se apropriado em estudos de avaliação da exposição à HPAs.

Embora o Baiacu não tenha respondido da mesma maneira que a Corvina, não se pode deixar de notar a relevância da utilização desta espécie no trabalho desenvolvido. Os Baiacus mostraram-se sensíveis a contaminação por metabólitos do Naftaleno que têm origem petrôgenica. A contaminação de ambientes aquáticos por fontes petrogênicas vem causando grande preocupação devido a crescente demanda pelo uso do petróleo para obtenção de energia e conseqüente aumento de derrames deste óleo gerado pelas atividades de extração ou a ela associadas³⁴.

A distinta responsividade entre Baiacu e Corvina aos efeitos da contaminação de HPAs pode ser devida a uma série de fatores, como diferenças metabólicas, dos hábitos alimentares e de regionalidade²⁸.

Desta forma, foi relevante o uso das duas espécies de peixes, já que as estas responderam de forma distinta à contaminação por HPAs. Este fato mostra a necessidade de que em monitoramentos ambientais, onde não haja dados pregressos sobre os organismos em estudo, seja utilizada mais de uma espécie bioindicadora.

6 – CONCLUSÃO

- A implementação e otimização dos métodos de Fluorescência Fixa (FF) e Fluorescência sincronizada (SFS) permitiu que os metabólitos de Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno e o 1-Hidroxi-pireno fossem determinados de forma semiquantitativa nas biles de Baiacu e Corvina. Desta forma, foi possível avaliar a exposição destas espécies a HPAs de origem pirogênicas e petrogênicas.
- A relativa simplicidade dos métodos de fluorescência empregados possibilitou que fosse feito um estudo com grande número de espécimes diminuindo a chance de resultados enviesados causados por variabilidade biológica das espécies.
- O Fator de Condição, mesmo sendo um biomarcador geral de contaminação, mostrou-se como uma ferramenta útil na avaliação do estado de saúde geral dos peixes em estudo.
- O biomarcador específico para exposição a HPAs utilizado neste trabalho sofreu pouca influência dos parâmetros não relacionados à poluição por HPAs, tais como sexo e tamanho dos peixes. Desta forma, este biomarcador se mostrou bastante robusto para avaliação da exposição de peixes a esta classe de composto.
- A avaliação do status alimentar dos peixes, medido através da normalização dos dados de determinação dos metabólitos de HPAs pelas proteínas biliares, foi fundamental pois trouxe novo perfil de resposta dos peixes quando se realizou a comparação da exposição destes espécimes a HPAs da Baía de Guanabara e Itaipu.
- A escolha de duas espécies bioindicadoras foi fundamental para avaliar os níveis de exposição dos organismos aquáticos a HPAs, uma vez que as espécies mostraram respostas distintas frente à contaminação por esta classe de composto. A Corvina mostrou-se como candidata ideal à espécie sentinela em estudos que utilizem este biomarcador de exposição a HPAs.

- Através deste trabalho foi possível distinguir entre o nível de exposição dos peixes da BG e de Itaipu mesmo sendo esta área controle próxima a BG e sujeita a influências desta baía.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Prósperi VA, Nascimento IA. Avaliações ecotoxicológicas de ambientes marinhos estuarinos. In: Zagatto PA, Bertoletti E, organizadores. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa; 2006. p.269-292.
- 2- Nelson JS. *Fishes of the world*. New York: John Wiley & Sons; 1994.
- 3- US Environmental Protection Agency.
<http://www.epa.gov/bioindicators/aquatic/marine.html> (acessado em 16/Jun/2008).
- 4- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/costeiros.htm> (acessado em 16/Jun/2008).
- 5- Ricklefs, RE. Comunidades Biológicas: O Conceito de Bioma. In: *A Economia da Natureza*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 110.
- 6- Moscoso J, Rudolph A, Sepúlveda RD, Suárez C. Effect of Temporary Closure of the Mouth of an Estuary on the Benthic Macroinfauna: Lenga-Chile, A Case Study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2006; 77: 484-491.
- 7- Monteiro- Neto C, Tubino RA, Moraes LES, Neto, JPM, Esteves GV, Fortes WL. Associações de peixes na região costeira de Itaipu, Niterói, RJ. *Iheringia, Série Zoologia* 2008; 98(1): 50-59.
- 8- Guimarães GP, Mello WZ. Estimativa do Fluxo de Amônia na Interface ar-mar na Baía de Guanabara – Estudo Preliminar. *Quimica Nova* 2006; 29(1): 54-60.
- 9- Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente.
<http://www.feema.rj.gov.br/baia-guanabara.asp?cat=75> (acessado em 16/Jun/2008).
- 10- Barreto CF, Da Luz CFP, Baptista-Neto JA, Vilela CG, Barth OM. Palynological analysis of a sediment core obtained in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79(2): 223-234.

11- Kjerfve B, Ribeiro CHA, Dias GTM, Filippo AM, Quaresma VS. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research* 1997;17(13): 1609-1643.

12- Egler CAG, Cruz CBM, Hald Madsen PF, Costa SM, da Silva EA. Proposta de Zoneamento Ambiental da Baía de Guanabara. *Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ* 2003; 26: 127-138.

13- Salvador MVS, Silva MAM. Morphology and sedimentology of the Itaipu Embayment – Niterói /RJ. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2002; 74(1): 127–134.

14- Saberweb

<http://www.saberweb.com.br/praias-do-brasil/baias-do-brasil/baia-de-guanabara.htm>
(acessado em 15/jan/2006).

15- Shahidul Islam M, Tanaka M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 2004; 48: 624-649.

16- Fent K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 2004; 205: 223–240.

17- US Environmental Protection Agency.

<http://www.epa.gov/bioindicators/aquatic/pollution.html> (acessado em 16/Jun/2008).

18- Agência Nacional de Águas.

<http://www.ana.gov.br/pnrh/DOCUMENTOS/5Textos/6-9EcosistemasAquaticos.pdf>
(acessado em 16/Jun/2008).

19- Instituto Baía de Guanabara.

http://www.portalbaiadeguanabara.org.br/portal/exibe_sub.asp?id_sub=12 (acessado em 16/Jun/2008).

- 20- Azevedo LA, de Andrade Brüning IMR, Moreira I. Hydrocarbon contamination in mussels from Guanabara Bay. *Marine Pollution Bulletin* 2004; 49: 1109-1126.
- 21- Cruz CBM, Teixeira AJA, Barros RS, Argento MSF, Mayr LM, Menezes PML. Carga Antrópica da Bacia Hidrográfica da Baía de Guanabara. *Anais IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto* 1998; Santos, Brasil.
- 22- Barbosa SRCS, Begossi A. Fisheries, Gender and Local Changes at Itaipu Beach, Rio de Janeiro, Brazil: an individual approach. *Multiciência: arte e ciência* 2004; 2: 1-14.
- 23- Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Barsiene J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2006;53: 479-487.
- 24- Silva DMA, Buzitis J, Krahn MM, Bicego MC, Pires-Vanin MAS. Metabolites in bile from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin* 2006; 52: 175-183.
- 25- Netto, ADP, Moreira, JC, Dias, AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS, Berek J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química Nova* 2000; 23(6): 765-773.
- 26- Ariese F, Beyer J, Jonsson G, Visa CP, Krahn MM. Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile. *ICES Techniques in marine environmental sciences* 2005; 39:1-41.
- 27- ATSDR. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (Update), August. Prepared by Research Triangle Institute for the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), United States Department of Health and

Human Services (USDHHS), Public Health Service (PHS), Centers for Disease Control (CDC). 1995; ATSDR, CDC. Atlanta, Georgia.

28- Logan DT. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 2007; 13: 302-316.

29- Howsam M, Jones K. Sources of PAHs in the Environment in PAHs and Related Compound. In: *Handbook of Environmental Chemistry*. Springerlink; 1998.

30- Lin E, Cormier S, Torsella J. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed wavelength fluorescence: comparison with HPLC- fluorescent detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1996; 35: 16-23.

31- Reza J, Trejo A, Vera-Ávila LE. Determination of the temperature dependence of water solubilities of polycyclic aromatic hydrocarbons by a generator column-on-line solid-phase extraction liquid chromatographic. *Chemosphere* 2002; 47: 933-945.

32- Olatubi OA. Metabolism of mixtures of polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAHs) by *Cunninghamella elegans* [Dissertação de Mestrado]. Texas: A&M University; 2005.

33- Mackay D, Callcott D. Partitioning and Physical Chemical Properties of PAHs – Chemistry. In: *Handbook of Environmental Chemistry*. Springerlink; 1998.

34- Neves RLS. Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes Mugil liza. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Programa de Pós- graduação em Química da PUC-Rio; 2006.

35- Beek B, Böhling S, Bruckmann U, Franke C, Jöhncke U, Studinger G. The Assessment of Bioaccumulation in Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans. In: *Handbook of Environmental Chemistry*. Springerlink; 2000.

- 36- Mackay D, Paterson S, Shiu WY. Generic models for evaluating the regional fate of chemicals. *Chemosphere* 1992; 24(6): 695-717.
- 37- Zitko V. Marine Pollution. In: *Handbook of Environmental Chemistry*. Springerlink; 2000.
- 38- Lima A.L.C. Geocronologia de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) – Estudo de caso: Baía de Guanabara. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro: Programa de Pós- graduação em Química da PUC-Rio; 1996.
- 39- Fenet H, Gomez E, Rosain D, Casellas C. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and 7 – ethoxyresorufin – *O*- deethylase activity in caged european eels. *Arc. Environ. Contam. Toxicol* 2005; 51: 232-236.
- 40- Casarett & Doull's. *Principles of Toxicology*. New York: Toxicology- The Basic Science of Poisons. Edition. 5th; 1996.
- 41- Collier TK, Varanasi U. Hepatic activities metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English Sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1991; 20: 462-473.
- 42- Miller K.P, Ramos K.S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews* 2001; 33(1): 1-35.
- 43- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK. PAH metabolites in bile, Cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 2000; 51: 241-258.
- 44- *Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories – Volume 2: Risk Assessment and Fish Consumption Limits*. Washington, DC: EPA; 2000.

- 45- Yamada M, Tanaka H, Toyoda K, Yoshida A, Shibata A, Nombra H, et al. Study on the fate of petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the effect of chemical dispersant using an enclosed ecosystem mesocosm. *Marine Pollution Bulletin* 2003; 47: 105-113.
- 46- Malins DC, McCain BB, Myers MS, Brown DW, Krahn MM, Roubal WT, Schewe MH, Landahl JT, Chan S-L. Field and laboratory studies of the etiology of liver neoplasms in marine fish from Puget Sound. *Environmental Health Perspectives* 1987; 71: 5-16.
- 47- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, McCain BB. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S West Coast. *Environmental Health Perspectives* 1991; 90: 7-15.
- 48- Yang X, Baumann PC. Biliary PAH metabolites and hepatosomatic index of brown bullhead from Lake Erie tributaries. *Ecological Indicators* 2006; 6: 567-574.
- 49- Barsiene J, Lehtonen KK, Koehler A, Broeg K, Vuorinen PJ, Lang T, Pempkowiak J, Syvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Repecka R, Vuontisjärvi H, Kopecka J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin* 2006; 53: 422-436.
- 50- Wells PG, Depledge, MH, Butler JN, Manock JJ, Knap AH. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 2001; 42(10): 799-804.
- 51- Fuentes-rios D.; Orrego R, Rudolph A, Mendoza G, Gavilán JF, Barra R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 2005; 61(2): 192-199.
- 52- Lam PKS, Gray JS. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 2003; 46(2): 182-186.

- 53- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13: 57-149.
- 54- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CM, Pinho GL, et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology* 2007; 146(1-2): 221-34.
- 55- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The* 2000; 247(2-3): 295-311.
- 56- Monserrat JM, Geracitano LA, Bianchini A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology* 2003; 9: 255-269.
- 57- Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 2006;15(4): 333-340.
- 58- Aas E, Beyer J, Goksoyr A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: na evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 2000; 5(1): 9-23.
- 59- Callisto M, Gonçalves J.F, Moreno P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. In: Goulart, E.M.A. *Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais*; 2005. p. 555-567.
- 60- Ruddock PJ, Bird DJ, McCalley DV. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2002; 51: 97-105.

61- Van den Hurk P. Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants. *Aquatic Toxicology* 2005; 77: 202-209.

62- Bizerril CRSF. Peixes marinhos do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR, 2001.

63- Fishbase.

<http://www.fishbase.org> (acessado em 10/abril/2008).

64- Alves DR, Luque JL. Community Ecology of the Metazoan Parasites of White Croaker, *Micropogonias furnieri* (Osteichthyes: Sciaenidae), from the Coastal Zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96(2): 145-153.

65- Oliveira JS. Determinação dos níveis de toxicidade em peixes marinhos da família Tetraodontidae (Osteichthyes, Teleostei) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo. Instituto de Biociências da USP; 1998.

66- Rotundo M M, Dias J S, Zavala-Camin L A. Síntese histórica do conhecimento sobre baiacus. In: I Simpósio Brasileiro de Oceanografia. São Paulo; 2002.

67- Aquarienfotografie.

<http://forum.aquarienfotografie.net/viewtopic.php?f=18&t=1827&p=13179&hilit=spinosus#p13179> (acessado em 5/fev/2006).

68- Barra R, Sanchez-Hernandez JC, Orrego R, Parra O, Gavilan JF. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere* 2001; 45: 439-444.

69- Dissanayake A, Galloway TS. Evaluation of fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrophotometry as a biomonitoring tool of environmental contamination. *Marine Environmental Research* 2004; 58: 281-285.

- 70- Valeur B. Molecular Fluorescence - Principles and Applications. Wiley-VCH; 2002.
- 71- Gilbert A, Baggot J. Essentials of Molecular Photochemistry. Blackwell Scientific Pub; 1991.
- 72- Suppan P. Chemistry and Light. Royal Society of Chemistry; 1994.
- 73- Finete VLM. Desenvolvimento de métodos espectrofluorimétricos para a determinação de eritromicina e canamicina e aplicabilidade na vacina contra a febre amarela. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio; 2005.
- 74- Krahn M, Burrows D, MacLeod Jr W, Malins D. Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolyzed bile of English sole (*Parophrys vetulus*) from polluted sites in Puget Sound, Washington. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1987; 16: 511-522.
- 75- Ariese F, Burgers I, Oudhoff K, Rutten T, Stroomberg G, Vethaak D. Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring. Institute for Environmental Studies 1997.
- 76- Krahn M, Myers MS, Burrows DG, Malins DC. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. Xenobiótica 1984; 14: 633-646.
- 77- Vuontisjärvi H, Keinänen M, Vuorinen PJ, Peltonen K. A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. Taylor & Francis 2004; 24: 333-342.
- 78- User's Guide LS 45 da Perkin Elmer
- 79- Flickr.
<http://www.flickr.com/photos/quasebart/1475790745/> (acessado em 2/jul/2008)

80- Nitvista.

http://www.nitvista.com/galeria/mm_foto10.jpg (acessado em 2/jul/2008)

81- Ariese F, Beyer J, Wells D. Two fish bile reference materials certified for PAH metabolites. *Jornal of Environmental Monitoring* 2005.

82- Pinheiro MAA, Taddei FG. Relação peso/largura da carapaça e fator de condição em *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Trichodactylidae), em São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 2005; 22(4): 825-829.

83- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology* 1993; 26: 273-286.

84- Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 1977; 83: 346-356.

85- Berlman IB. Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules. In: *Handbook of Photochemistry*. Academic Press, New York; 1971.

86- Vives I, Grimalt JO, Fernández P, Rosseland B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland. *Science of Total Environment* 2004; 324: 67-77.

87- Richardson DM, Gubbins MJ, Davies I M, Moffat CF, Pollard PM. Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin concentration in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2004; 17: 79-85.

88- Amador E S. Baía de Guanabara e Ecossistemas Periféricos: Homen e Natureza. 1 ed. Rio de Janeiro; 1997, *apud*: Sampaio M. Estudo de circulação hidrodinâmica 3d e trocas de massas d'água da baía de guanabara – RJ. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Programa de pós-graduação de engenharia da universidade federal do rio de janeiro (UFRJ); 2003.

89- Sampaio M. Estudo de circulação hidrodinâmica 3d e trocas de massas d'água da Baía de Guanabara – RJ. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Programa de pós-graduação de engenharia da universidade federal do rio de janeiro (UFRJ); 2003.