

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de Estudo

A costa Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro é uma região de extrema importância para a economia do país e compreende a Região dos Lagos e Norte Fluminense (Figura 9).

A Região dos Lagos está localizada a 150 km da cidade do Rio de Janeiro e destaca-se como a principal região para o mercado turístico do Estado (Hughes, 1996). Desde a década de 1970 tem sofrido ocupação territorial desordenada e tem sido observado um progressivo aumento populacional, sem a necessária infraestrutura e com baixíssimas exigências urbanísticas e ambientais (WHO, 1990; Hagmar et al., 2006).

Já a Região do Norte Fluminense sofreu intensa urbanização nas últimas décadas devido à descoberta de petróleo e este fato caracterizou esta região como um dos principais polos de extração e produção de petróleo do país (Fauré, 2003). A aparente evolução econômica e a especulação imobiliária, juntamente com a oferta de empregos, produziram nesta região uma ocupação desordenada e até predatória das áreas litorâneas (Kutz et al., 1991).

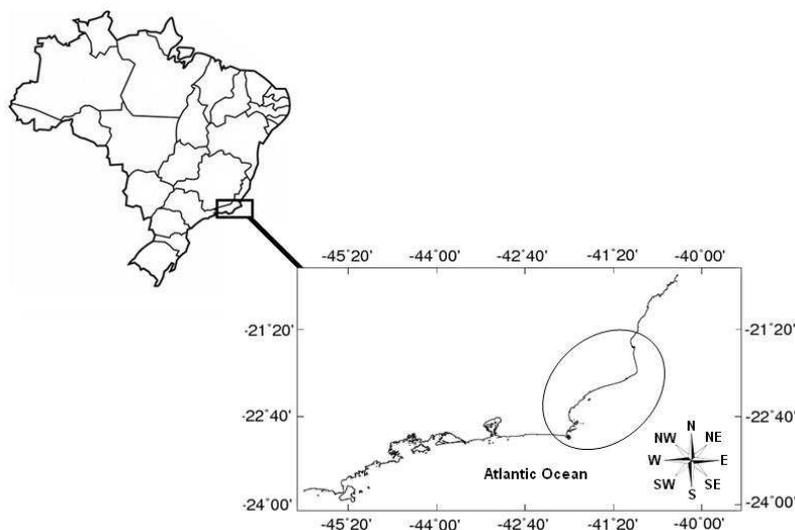


Figura 9: Região da Costa Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro

Outra razão que contribuiu para a intensa ocupação da Costa Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro foi a proximidade ao Rio Paraíba do Sul, que nasce na Serra da Bocaina em São Paulo e se estende por 1180 km, cortando três estados da Região Sudeste do Brasil, até desaguar no Oceano Atlântico em São João da Barra, no Norte Fluminense (Alonso, 2008). O rio Paraíba do Sul é utilizado como a principal fonte de abastecimento de água por cerca de 15 milhões de pessoas e 7000 indústrias que, por sua vez, possuem elevado potencial poluidor (Matuo et al., 1990).

Uma das principais características oceanográficas da Região dos Lagos é o fenômeno da ressurgência, que ocorre principalmente ao longo do verão e tem sua origem devido aos ventos que sopram na direção E-NE, ao longo da margem do continente e partem em direção ao mar aberto (Tanabe et al., 1998; Valentin, 2001). Este deslocamento das águas acaba sendo promovido pelo Desvio de Ekman e tem como consequência o afloramento de águas mais profundas (cerca de 300 m), que são frias e ricas em nutrientes (Valentin, 1984; Figueiredo et al., 2013). Um dos principais efeitos da ressurgência é a grande redução na temperatura das águas na região, pois as mesmas atingem valores de 15 °C ou até menos, o que difere totalmente do esperado, pois normalmente a temperatura das águas deveria variar entre 25 e 27 °C em função da passagem da Corrente do Brasil (Mason e Sheu, 2002).

A ressurgência está associada à estrutura trófica da região, uma vez que a ocorrência de florações do fitoplâncton, que é a base da cadeia alimentar, está diretamente relacionada a este fenômeno devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes que o fenômeno promove (Valentin et al., 1987). Desta forma, o gradual aumento da produção primária promove a transferência de energia para os mais altos níveis tróficos, garantindo às regiões onde ocorre a ressurgência um significativo estoque pesqueiro (De-Léo e Pires-Vanin, 2006; Sydeman et al., 2014). Então, a região da Costa Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro se configura por sua rica biodiversidade e também por ser rota de muitos animais marinhos, tais como os mamíferos aquáticos (Santos e Haimovici, 2001).

Por fim, a ressurgência também pode atuar na mobilização dos POPs presentes na matéria orgânica dos sedimentos e no material particulado, trazendo-

os de volta à coluna d'água ou às camadas mais superficiais dos oceanos (Stemmler, 2010).

## **4.2 Caracterização das Espécies Utilizadas**

### **4.2.1 Pequenos Cetáceos / Espécies Sentinela**

As espécies caracterizadas como pequenos cetáceos são mamíferos aquáticos que ocorrem em todas as bacias oceânicas e mares do mundo, bem como nas bacias hidrológicas da Ásia e América do Sul (Di Benedetto et al., 2010). Estes mamíferos se apresentam através de aproximadamente 70 espécies já conhecidas e seus tamanhos podem variar entre 9,0 m, no caso de uma orca (*Orcinus orca*), e 1,7 m, no caso do Golfinho Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) (Campos et al., 2011).

Os botos e golfinhos compreendem algumas espécies de mamíferos marinhos já relativamente bem conhecidos em função de seus aspectos biológicos e ecológicos, porém outras características como distribuição e/ou hábito alimentar ainda permanecem como incógnitas (Campos et al., 2011).

Historicamente, os pequenos cetáceos estão expostos a uma série de ameaças devido às atividades antrópicas, tais como as capturas acidentais e intencionais, degradação dos ambientes costeiros, tráfego de embarcações aquáticas e, principalmente, devido à poluição dos ambientes costeiros (Sherman, 2000; Gulland e Hall, 2007).

Os pequenos cetáceos são organismos que se encontram no topo da cadeia alimentar, estão sujeitos aos efeitos da biomagnificação causada por POPs e podem representar bons indicadores de poluição nas regiões estudadas (Bard, 1999). Além disso, estes poluentes podem causar severos problemas ao sistema imunológico, aumentando os riscos às doenças infectocontagiosas, gerando má formação fetal, além de causarem problemas neurológicos e reprodutivos (Tanabe, 2002; Ross e Birnbaum, 2003).

De acordo com Fleming et al. (2006), há uma relação direta entre a saúde humana e os oceanos, que incluem as grandes alterações globais, a multiplicação de algas nocivas e a contaminação química e microbiana das águas e seus recursos. De certa forma, a interação entre a saúde humana e a dos oceanos é atribuída à crescente ocupação das zonas próximas às áreas costeiras em todo o planeta, onde habitam cerca de 50% da população mundial, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Stewart et al., 2008). Esta ocupação da região costeira normalmente ocorre de forma desordenada e é a principal responsável pela degradação destas áreas (Hacon et al., 2005).

Assim, o reconhecimento de certas doenças nos pequenos cetáceos apresenta grande importância para a indicação de problemas na saúde dos oceanos e, conseqüentemente, para os potenciais riscos à saúde de seres humanos (Bossart, 2006).

Em razão de sua longevidade, localização no topo da cadeia alimentar, relativo teor lipídico corporal e limitada capacidade em metabolizar poluentes, os mamíferos marinhos emergem como espécies sentinelas (De Moura et al., 2014).

#### **4.2.2** **Boto cinza (*Sotalia guianensis*)**

O gênero *Sotalia* há alguns anos atrás era considerado como monoespecífico (*Sotalia fluviatilis*) e era constituído por uma espécie marinha e uma fluvial. Entretanto, através de técnicas de análises morfométricas e filogenéticas de DNA mitocondrial, ocorreu a separação entre duas espécies: *S. fluviatilis*, oriunda de águas doces e *S. guianensis*, habitante de regiões estuarinas (Rosas et al., 2003; Caballero et al., 2007).

O Boto-cinza (*S. guianensis*) (Figura 10) é uma espécie costeira de golfinho que se distribui ao longo da costa de Santa Catarina até Honduras (Figura 11), na América Central (Flores e Da Silva, 2009), habitando principalmente águas rasas (de até 5 m de profundidade). O boto-cinza, ao contrário das demais espécies de cetáceos, apresenta altíssima fidelidade ao seu habitat (Santos, M. C. et al., 2001; Azevedo et al., 2007).



O *S. guianensis* é um conhecido representante da família Delphinidae e vive em média 30 anos. Geralmente, sua gestação ocorre entre 11 e 12 meses e as crias nascem com tamanhos entre 90 e 106 cm de comprimento. Atingem a maturidade sexual por volta dos 6 anos de idade e maturidade física ocorre aos 7 anos de idade, quando o indivíduo apresenta um comprimento média de 180 cm (Di Benedetto e Ramos, 2004). Já o comprimento máximo registrado para a espécie é de 220 cm, com um peso total de 121 Kg (Rosas, F. C. W. e Monteiro-Filho, E. L. A., 2002).

Em análises estomacais realizadas por Di Benedetto e Siciliano (2007) foram encontradas como principais presas de *S. guianensis* peixes pelágicos, demersais, incluindo o peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) e lulas (*Loligo plei* e *Loligo sanpaulensis*).

Devido à sua ampla distribuição ao longo da costa brasileira, o Boto-cinza é a segunda espécie mais ameaçada pelas redes de pesca (Siciliano, 1994; De Moura et al., 2009), assim como pela poluição ambiental e outras alterações ambientais dos ambientes estuarinos (Campos et al., 2011).

#### 4.2.3 Golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*)

Apesar de não ser uma das espécies mais conhecidas pela população brasileira de uma forma geral, o *S. bredanensis* (Figura 12) é bastante encontrado em águas do país (Siciliano et al., 2006). Na verdade, o golfinho-de-dentes-rugosos está amplamente distribuído ao longo de todos os oceanos temperados, tropicais e subtropicais do mundo (Figura 12) (Jefferson, 2009).



Figura 12: Grupo de golfinhos-de-dentes rugosos observado na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. (Adaptado de Siciliano e Flach (2007)).

Esta espécie é diferenciada dos demais golfinhos devido à ausência de uma demarcação de cor mais clara entre seu rosto e o melão, o que proporciona uma aparência cônica à sua cabeça (Pitman e Stinchcomb, 2002).

A cor de seu corpo é escura, com uma “capa” bem definida. Sua região ventral e lateral apresentam tons mais claros, enquanto que seu dorso possui coloração cinza-escuro (Lodi e Hetzel, 1999). Seu crescimento ocorre de forma rápida nos primeiros cinco anos de vida, o comprimento máximo reportado para ambos os sexos foi de 280 cm e seu peso pode atingir os 155 Kg. Os machos atingem a maturidade sexual por volta dos 14 anos ou 225 cm, ao passo que as fêmeas atingem esse estágio aos 10 anos e 210 cm (Miyasaki e Perrin, 1994; Struntz, W. D. et al., 2004) e sua longevidade é estimada em 32 anos (Perrin et al., 1994).

Geralmente, os golfinhos-de-dentes-rugosos são avistados em grupos pequenos (entre 10 e 20 indivíduos), porém já foram reportados grupos contendo aproximadamente 50 animais (Struntz, W. D. et al., 2004). Entretanto, é comum observar esta espécie nadando em conjunto com outras espécies de cetáceos, tais como baleias-jubarte, baleias-piloto, golfinhos-rotadores e golfinhos-nariz-de-garrafa (Lodi, 1992).

Sua dieta pode ser muito variada, que inclui tanto peixes pelágicos quanto lulas, com destaques para o peixe-espada (*Trichiurus lepturus*), que é um peixe topo de cadeia e pode acumular consideráveis níveis de poluentes (Lodi e Hetzel, 1999; Gurjão e Neto, 2004). Por não ser uma das espécies mais estudadas de golfinhos, os dados de conservação e algumas outras características gerais do *S. bredanensis* ainda permanecem desconhecidas, o que torna importante o estudo desta espécie (Siciliano et al., 2006).



Figura 13: Distribuição geográfica do *S. bredanensis* (Adaptado de Campos et al. (2011)).

#### 4.2.4 Toninha ou franciscana (*Pontoporia blainvillei*)

A toninha (Figura 14) é considerada por muitos autores uma das menores espécies de golfinhos existentes, uma vez que a maioria dos indivíduos não ultrapassa os 175 cm (Ramos et al., 2000).

As fêmeas, em geral, são maiores do que os machos e os filhotes nascem com tamanhos que variam entre 70 e 80 cm (Santos et al., 2009). A maturidade sexual é atingida entre 2 e 5 anos, não havendo grandes diferenças entre machos e fêmeas (Costa et al., 2009; Del Castillo et al., 2014). A toninha pode viver em torno de 20 anos (Siciliano et al., 2002). De acordo com Ramos et al. (2000), as fêmeas de Toninhas do Norte do Estado do Rio de Janeiro atingem a maturidade sexual com aproximadamente 130 cm de comprimento e os machos com aproximadamente 115 cm.

Seu corpo possui coloração uniforme e pode variar entre cinza e ocre, com a região ventral mais clara. Sua nadadeira dorsal é pequena e possui formato arredondado, enquanto que as nadadeiras peitorais são largas e possuem o formato de uma espátula. O melão é pequeno e bem delimitado. Possui rosto largo e este corresponde a 10% do tamanho corporal. Seus dentes são pequenos e muito afiados, podendo atingir mais de 210 (Crespo et al., 1998; Ramos et al., 2000).

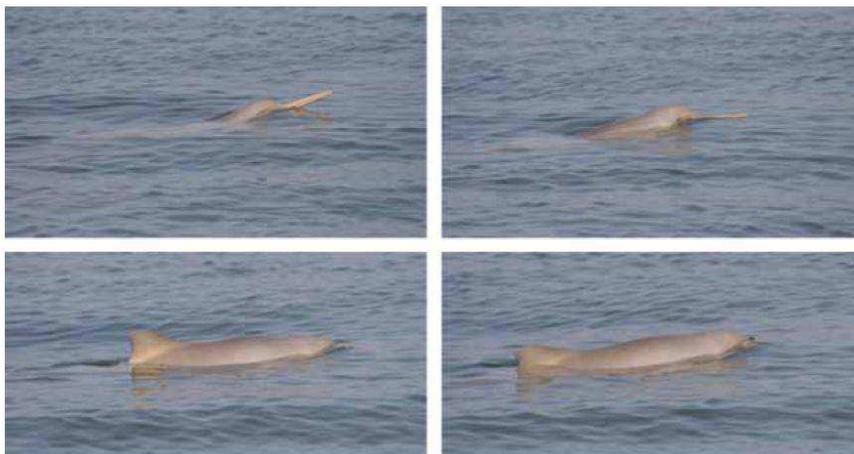


Figura 14: *Pontoporia blainvillei* (Toninha). Fonte: Bordino et al. (2002).

Estes golfinhos habitam águas turvas e com profundidades médias de 30 metros. Vivem principalmente em grupos pequenos, de 2 a 5 indivíduos, mas

existem registros de grupos contendo até 17 animais. A franciscana ocorre desde o Estado do Espírito Santo até o Golfo de San Matias, na Argentina (Crespo et al., 1998; Flores, 2009). A distribuição da *P. blainvillei* não é contínua entre os limites setentrional e meridional, havendo dois hiatos ao longo de sua ocorrência (Figura 15) (Siciliano et al., 2002). Essa fragmentação em sua distribuição corresponde às regiões localizadas entre Regência (19°40'S) e Barra do Itabapoana (21°25'S), e entre Macaé (22°25'S) e a Baía da Ilha Grande (23°S). Entre as possíveis razões para estes hiatos, destacam-se a temperatura, turbidez e profundidade das águas (Di Benedetto, Ramos e Lima, 2001; Siciliano et al., 2006).

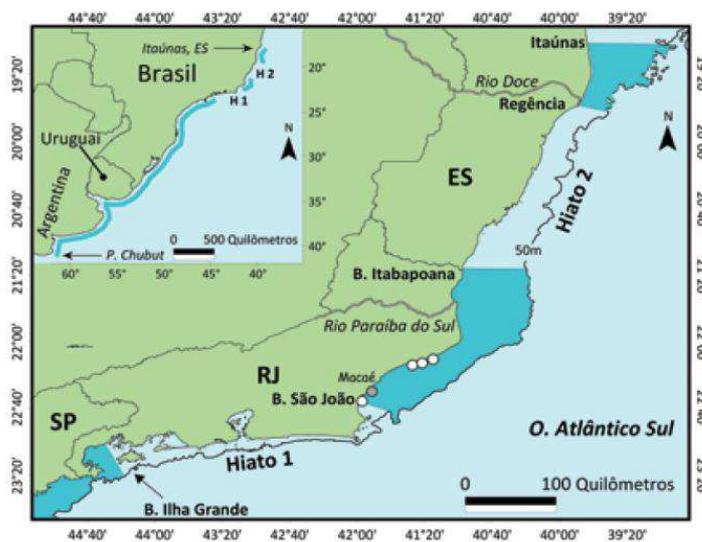


Figura 15: Distribuição da Toninha na Costa Sudeste do Brasil e a existência de dois hiatos. Fonte: (Siciliano et al., 2006).

Esta espécie possui uma dieta variada, onde se destacam como principais presas peixes de pequeno porte, lulas e camarões, os quais estão amplamente associados a regiões estuarinas e costeiras (Di Benedetto, Ramos e Arruda, 2001; Santos et al., 2002). Os peixes possuem papel principal na dieta dos filhotes que estão iniciando a alimentação a base de sólidos e, em geral, o tamanho destas presas não supera 10 cm (Siciliano et al., 2006b).

Atualmente, a franciscana é dada como o cetáceo mais ameaçado na parte ocidental do Atlântico Sul devido às altas taxas de mortalidade acidental em redes de pesca ao longo de toda a sua distribuição geográfica (Seixas et al., 2007). A região entre o Norte Fluminense e o Espírito Santo deve receber uma atenção

especial quanto à mortalidade desta espécie, pois as populações são muito reduzidas e os indivíduos encontram-se geograficamente isolados (Di Benedetto, Ramos e Arruda, 2001).

#### 4.2.5 Golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*)

Esta espécie de golfinhos é, sem dúvidas, a mais conhecida pela população mundial, de uma forma geral, por ser constantemente exposta em aquários e na televisão (Siciliano et al., 2006).

O golfinho-nariz-de-garrafa (Figura 16) possui tamanho relativamente grande, chegando até 400 cm de comprimento e pesando 450 Kg. Possui cor cinza-escuro em seu dorso, com clareamento destas áreas até ventre, que apresenta coloração cinza-clara ou até mesmo rosa (Reeves e Smith, 2002).

Sua maturidade sexual pode variar de acordo com o sexo e a região habitada, uma vez que as fêmeas atingem esse estágio entre 5 e 12 anos de idade e os machos entre 10 e 13 anos nos Estados Unidos (Sayigh et al., 1999) e na costa leste da África, os machos atingem este estágio entre 10 e 12 anos e as fêmeas por volta dos 14-15 anos (Campos et al., 2011). A gestação ocorre por, aproximadamente, um ano e os filhotes nascem com tamanhos que variam entre 84 e 140 cm (Reeves e Smith, 2002). Sua longevidade gira em torno de 40 a 50 anos (Wells e Scott, 1999).



Figura 16: Grupo de golfinhos da espécie *Tursiops truncatus*. Foto: Flip Nicklin/Minden Pictures.  
Fonte: <http://advocacy.britannica.com/blog/advocacy/2011/04/animals-in-the-news-73/dolphins/>

A distribuição (Figura 17) do *T. truncatus* é bem ampla e pode ocorrer em zonas tropicais e temperadas de todo o globo. Possui uma ampla plasticidade comportamental, podendo ser encontrado em diferentes habitats, desde regiões costeiras, estuários, lagoas e mares internos até águas pelágicas e ilhas oceânicas (Shaul et al., 2015). No Brasil, pode ser frequentemente observado em águas costeiras e estuários, mas cada vez mais são vistos em águas mais profundas, inclusive em ilhas oceânicas (Pinedo et al., 1992).

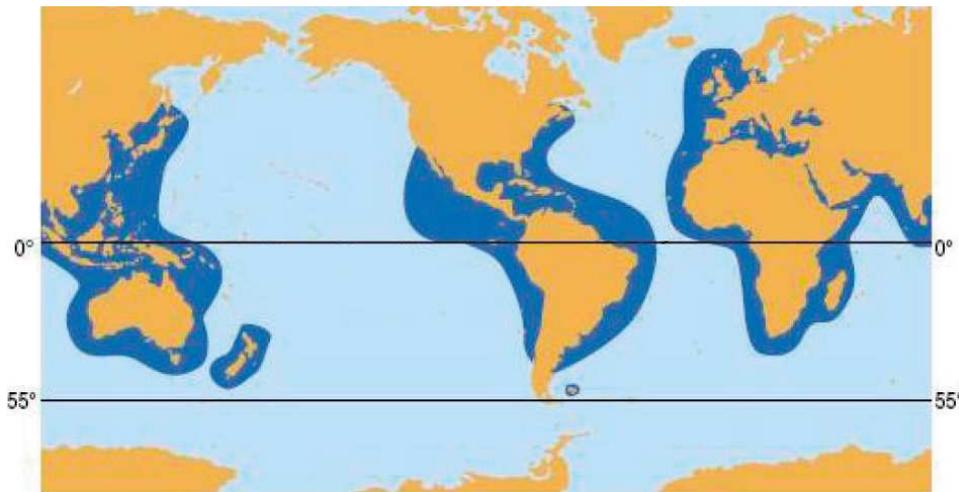


Figura 17: Distribuição geográfica do *T. truncatus*. Adaptado de Bastida et al. (2007).

Geralmente, o golfinho-nariz-de-garrafa é observado em grupos de 20 a 50 indivíduos nas regiões costeiras, porém existem registros de grupos com mais de 100 animais (Di Benedetto, Ramos e Lima, 2001; Azzelino et al., 2008)

O *T. truncatus* geralmente se alimenta de lulas e peixes como peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) (Siciliano et al., 2006b), linguado (*Syacium* sp.) e mamagá-liso (*Dules auriga*) (Melo, C.L.C.; et al., 2010). Além disso, esta espécie é considerada um predador oportunista, uma vez que se alimenta sempre das presas que aparecem em maior quantidade na ocasião (Santos, M. B. et al., 2001; Struntz, D. J. et al., 2004).

Há algumas décadas foi amplamente caçado no Mar Negro, tendo os turcos e russos como principais causadores de um declínio populacional considerável para a espécie. Atualmente, o maior risco às populações do golfinho-nariz-de-garrafa está relacionado às capturas acidentais em redes de pesca,

principalmente por se tratar de um golfinho com hábitos costeiros (Siciliano et al., 2006).

#### 4.2.6

#### **Golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*)**

O golfinho-pintado-do-Atlântico (Figura 18) é uma espécie de golfinho de porte médio, que pode atingir até 230 cm e 145 Kg, não havendo grandes diferenças entre machos e fêmeas (Siciliano et al., 2006). Geralmente, os filhotes desta espécie nascem com aproximadamente 100 cm e, ao nascerem, apresentam uma coloração branca em seu ventre, uma capa lateral cinza-clara e uma capa dorsal cinza-escura (Moreno et al., 2005).

À medida que atingem a maturidade física, este padrão é mantido, mas surgem pintas ao longo de todo seu corpo, principalmente em seu ventre e dorso (Herzing, 1997). Seu rosto tem comprimento médio e é fortemente demarcado por seu melão (Perrin e Geraci, 2002).



Figura 18: Grupo de golfinhos da espécie *Stenella frontalis*. Foto: Al Sweeting Jr. Fonte: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/kerr\\_rebe/](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/kerr_rebe/).

A distribuição do *S. frontalis* é bem ampla (Figura 19), ocorrendo desde o Estado americano de Massachussets até o Rio Grande do Sul (Herzing et al., 2003) em águas costeiras desde 10 metros de profundidade até o limite da plataforma continental (Perrin et al., 1994).

Esta espécie pode estar dividida entre duas populações diferentes, visto que há um hiato em sua distribuição desde o norte do Espírito Santo até o sul da

Paraíba (Figura 20) (Siciliano et al., 2006b; Caballero et al., 2013). A região da Bacia de Campos se torna, então, o limite norte da distribuição da espécie da população mais ao sul do país. Comumente nesta área são reportadas avistagens de grupos desta espécie, assim como encalhes e capturas acidentais (Moreno et al., 2005; Paro et al., 2014).



Figura 19: Distribuição do golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) ao longo do globo. Fonte: [http://cetuc.ucsd.edu/voicesinthesea\\_org/species/dolphins/atlanticSpotted.html](http://cetuc.ucsd.edu/voicesinthesea_org/species/dolphins/atlanticSpotted.html)



Figura 20: Distribuição descontínua do golfinho-pintado-do-Atlântico na costa brasileira. Fonte: Siciliano et al., 2006.

Esta espécie é comumente avistada em grupos que contêm menos de 50 indivíduos (Au e Herzing, 2003), mas no Brasil já foram avistados em grupos com aproximadamente 250 animais (Siciliano et al., 2007). Além disso, grupos mistos com outras espécies de golfinhos ocorrem eventualmente ao longo de sua distribuição.

*S. frontalis* se alimenta principalmente de lulas e peixes capturados no fundo ou ao longo da coluna d'água. Entre as suas presas principais estão as lulas da espécie *Loligo plei*, peixe-espada (*Trichiurus lepturus*), corvina (*Micropogonias furnieri*), polvo (*Octopus vulgaris*) e o linguado (*Syacium sp.*) (Melo, C.L.C.; et al., 2010; Lopes et al., 2012).

### 4.3 Peixes e Lulas

#### 4.3.1 Peixe-espada (*Trichiurus lepturus*)

O *T. lepturus* (Figura 21) é uma espécie comumente encontrada em águas quentes e temperadas, com salinidades em torno dos 33 e 36 partes por milhão e temperaturas superiores a 15 °C (Bittar et al., 2008). Pode ser encontrado na América desde o Canadá até a costa da Argentina em uma faixa que abrange desde a região costeira até 350 metros de profundidade (Magro et al., 2000).

O hábito alimentar do peixe-espada se caracteriza pelo comportamento oportunista e voraz (Bittar et al., 2009), uma vez que a espécie é predominantemente piscívora e, em alguns casos, pratica até mesmo o canibalismo. Entretanto, crustáceos e cefalópodes também fazem parte da sua dieta. Devido aos seus hábitos alimentar e de vida, os indivíduos adultos ocupam o nível trófico subsequente a elasmobrânquios (tubarões e raias) e pequenos cetáceos (Chiou et al., 2006).

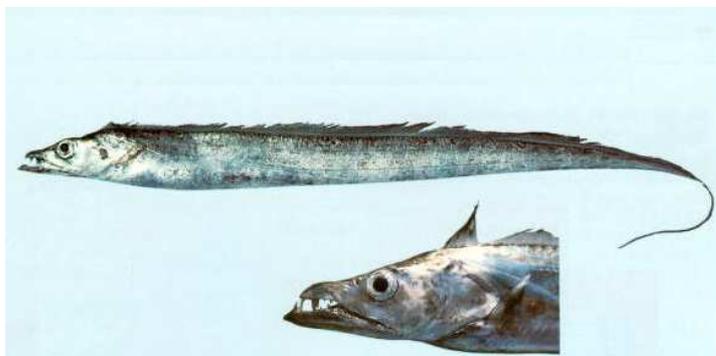


Figura 21: Peixe-espada (*Trichiurus lepturus*). Fonte: (Sainsbury et al., 1985).

Além de possuir grande importância comercial, estando entre as seis espécies mais comercializadas em algumas regiões ao longo do mundo, apresenta altíssima relevância ecológica (Martins e Haimovici, 1997).

O peixe-espada pode ser constantemente encontrado em análises estomacais de pequenos cetáceos na costa brasileira (Di Benedetto, Ramos e Arruda, 2001; Di Benedetto e Siciliano, 2007). Além disso, especula-se que o *T. lepturus* se enquadra como potencial competidor trófico para a *Pontoporia blainvillei* (Basso, 2005).

#### 4.3.2

#### Corvina (*Micropogonias furnieri*)

A corvina (Figura 22) é um peixe marinho ósseo com escamas, que possui cor prateada, estrias amarelas nos flancos e pretas em seu dorso. O comprimento médio das corvinas encontra-se geralmente entre 19 e 61 cm e, comumente, atingem a maturidade sexual por volta dos 45 cm ou 4 anos de vida (Vazzoler, 1971; Vazzoler et al., 1973).

Esta espécie é considerada uma das espécies mais comuns e abundantes nos estuários da América do Sul e possui grande importância na pesca comercial e recreativa no Brasil, sendo capturada por redes de arrasto, de emalhe e linhas de pesca, gerando uma produção anual média na Região Sudeste de 8816 toneladas (IBAMA, 2008; Mendoza-Carranza e Vieira, 2008).



Figura 22: Corvina (*Micropogonias furnieri*). Fonte: <http://fishbase.sinica.edu.tw/photos/PicturesSummary.php?ID=7620&what=species>.

Nas Regiões Sul e Sudeste, geralmente realizam migrações para o interior de estuários e lagoas nos períodos de reprodução (Rodrigues, 2006). Estes

deslocamentos podem estar relacionados às condições hidrográficas da região, acompanhando os deslocamentos da convergência subtropical (Vazzoler e Santos, 1965).

*M. furnieri* é considerada uma espécie generalista-oportunista, que ao se alimentar, tira proveito de presas abundantes em determinadas épocas do ano (Morasche et al., 2010). Possui um amplo nicho trófico, onde se destacam as presas bentônicas. Comumente são observados em sua dieta macro e microcrustáceos, moluscos, poliquetas, copépodes e pequenos peixes (Vazzoler, 1991; Figueiredo e Vieira, 1998; Giberto et al., 2007; Da Silva, 2009).

### 4.3.3 Tainha (*Mugil liza*)

A tainha (Figura 23) é um peixe característico da família Mugilidae e possui uma ampla distribuição em águas tropicais e subtropicais de todo o globo, mas é encontrado principalmente nas regiões costeiras e estuarinas (Szpilman, 1991). No Brasil podem ser encontrada desde a costa do Maranhão até o Rio Grande do Sul (Citti, 2010).

Possui longo corpo, fusiforme com estrias escuras longitudinais que são alternadas com estrias claras e ausência quase total de escamas nas nadadeiras dorsais e anal (Albieri e Araújo, 2010).



Figura 23: Tainha (*Mugil liza*). Fonte: <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=0&ID=1090&what=species&TotRec=5>.

Esta espécie possui hábitos pelágicos, vivendo na coluna d'água ou na superfície. Os indivíduos mais jovens permanecem no estuário, ou seja, em

ambientes mais protegidos e calmos, os quais são ricos em alimentos até que suas gônadas iniciem a maturação sexual. Geralmente, esse estágio se inicia quando o tamanho do indivíduo atinge 40 cm (Menezes e Figueiredo, 1985; Bizerril e Costa, 2001). A *M. liza* pode formar grandes cardumes, principalmente em meio às suas migrações reprodutivas, quando entram nos estuários (Citti, 2010; Lemos et al., 2014).

São peixes detritívoros, que se alimentam de matéria orgânica oriunda de organismos mortos ou de fragmentos destes (animais e vegetais), mas também podem se alimentar de algas, tanto microscópicas quanto filamentosas, e de uma grande variedade de invertebrados que ocorrem na região bentônica (Oliveira, 1997; Froese e Pauly, 2008; Lemos et al., 2014).

#### **4.3.4** **Sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)**

A sardinha-verdadeira (Figura 24) constitui a principal espécie de pequenos peixes pelágicos explorados pela pesca comercial, contribuindo com percentuais entre 10 e 15% no total do pescado nacional (Dias-Neto et al., 2011).

São peixes de pequeno porte, com o corpo lateralmente comprido e prateado, os quais formam grandes cardumes e, geralmente, habitam baías e estuários (Whitehead, 1985). Podem apresentar comprimentos entre 9 e 27 cm e, geralmente, aos 21 cm já atingiram a maturidade sexual (Vazzoler, 1962; Moraes et al., 2012).



Figura 24: Sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). Fonte: <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?ID=1505&what=species>.

Até o presente momento, a nomenclatura *S. brasiliensis* é considerada para a sardinha-verdadeira que se distribui desde o Cabo de São Tomé, no Rio de Janeiro, até o Cabo de Santa Marta Grande, em Santa Catarina, uma vez que seu estado taxonômico ainda não está perfeitamente esclarecido (IBAMA, 2006). A *S. brasiliensis*, geralmente, apresenta variações de seu estoque, tendo esta um ciclo de vida sensível às mudanças oceanográficas como, por exemplo, o aumento da temperatura pode “encolher” o habitat adequado para a sua desova (Castello, 2010).

Seu hábito alimentar é essencialmente planctofágico, com uma dieta baseada em sua maioria por fitoplâncton, copépodes e ovos de organismos invertebrados (Kurtz, 1999; Martí, 2012). Possui um curto ciclo de vida, o qual não ultrapassa os 4 anos (Gergole e Valentini, 1994) e estão inseridas no agrupamento das espécies costeiras das áreas onde ocorre o fenômeno da ressurgência (Motta e Paiva, 2000).

#### **4.3.5 Cavalinha (*Scomber japonicus*)**

Cavalinha (Figura 25) é o nome usual dado a peixes de água salgada, com altos teores de proteínas e gordura. Pertencem à família do atum e do bonito e são, geralmente, encontrados em mares tropicais e temperados do Oceano Atlântico, Índico, Pacífico e Mar Mediterrâneo (Cengiz, 2012). No Brasil, distribui-se por todo o ambiente pelágico desde o Estado do Rio de Janeiro até a costa Norte da Argentina (Seckendorff e Zavala-Camin, 1985).

Esta espécie apresenta escamas muito pequenas, corpo alongado e cabeça cônica comprida e um focinho pontiagudo (Silveira e Rodrigues-Ribeiro, 1997). A cavalinha possui manchas na parte inferior de seu corpo, com o dorso azul-verdeado e o ventre e flancos apresentam coloração amarela-prateada com pintas de cor cinza (Hunter e Kimbrell, 1980). Geralmente, atingem a maturidade sexual com 1 ano de idade ou 21 cm (Simãozinho, 2011).



Figura 25: Cavalinha (*Scomber japonicus*). Fonte: <http://www.fishbase.org/Photos/Pictures/Summary.php?StartRow=1&ID=993&what=species&TotRec=9>.

Atualmente, esta espécie tem adquirido grande importância no mercado pesqueiro no Sul e Sudeste brasileiro, uma vez que se tornou uma alternativa de alimento devido ao seu potencial valor de mercado, ocupando o segundo lugar em importância na pescaria da sardinha (Simãozinho, 2011). A cavalinha é encontrada em grandes cardumes, principalmente nas zonas costeiras e, geralmente, encontra-se em águas mais superficiais, o que facilita a pesca com redes de arrasto, de fundo ou cerco (Hunter e Kimbrell, 1980; Cengiz, 2012).

A *S. japonicus* é considerada uma espécie oportunista quanto à sua alimentação, tendo como principais presas pequenos crustáceos, peixes e até mesmo lulas (Castro e Santana Del Pino, 1995; Abdallah et al., 2002).

#### 4.3.6 Lula Nerítica (*Loligo plei*)

A lula nerítica (Figura 26) pode ser encontrada desde a região costeira do Estado da Flórida, nos Estados Unidos, até o Rio Grande do Sul. Ela ocorre, geralmente, em águas mais mornas e seu limite austral está diretamente associado à influência das águas quentes da corrente do Brasil (Roper e Sweeney, 1984; Haimovici e Perez, 1991). O *L. plei* possui um manto comprido, delgado e cilíndrico e, na Região Sudeste do Brasil, os indivíduos machos capturados apresentam comprimento do manto entre 4 e 30 cm e as fêmeas entre 3 e 18 cm (Rodrigues e Gasalla, 2008).



Figura 26: Lula (*Loligo plei*). Fonte: <http://cephbase.eol.org/taxonomy/term/523>.

Constituem o grupo das espécies semipelágicas mais abundantes ao longo da plataforma continental. Entretanto, podem alcançar profundidades de 370 metros, uma vez que as lulas se concentram no fundo ao longo do dia e se dispersam na coluna d'água durante a noite (Perez et al., 2002).

O *L. plei*, assim como outras espécies desta mesma família, possui semelpariedade, ou seja, possuem um curto ciclo de vida e se reproduzem somente uma vez durante a vida. Seu ciclo de vida ocorre por cerca de um ano e os machos crescem mais rápido, atingindo tamanhos maiores do que as fêmeas (Pierce e Guerra, 1994; Boyle e Rodhouse, 2005).

Estudos indicam que o comportamento alimentar do *L. plei* está associado ao consumo de pequenos peixes, seguido por crustáceos e cefalópodes (Piatkowski et al., 2001). Além disso, as lulas apresentam importante papel nos ecossistemas costeiros de todo o mundo, uma vez que representam um elo importante na teia trófica, com presas e predadores, além de serem importantes itens na dieta de cetáceos, aves e peixes (Santos e Haimovici, 2001).

#### 4.4 Amostragem

As amostras de cetáceos foram coletadas a partir do encalhe ou de capturas acidentais destes indivíduos na Costa Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro, as quais possibilitaram a retirada de amostras de músculos e fígados. Foram utilizadas no presente estudo as espécies de golfinhos *Sotalia guianensis*, *Stenobredanensis*, *Pontoporia blainvillei*, *Tursiops truncatus* e *Stenella frontalis*. Todas

as amostras de cetáceos foram gentilmente cedidas pelo Grupo de Estudo de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos (GEMM-Lagos).

Já as amostras de peixes e lulas foram coletadas por pescadores locais desta região e transportadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório Especializado em Meio Ambiente da PUC-Rio, onde foram separadas amostras de músculos e fígados para as posteriores análises. Todas as amostras foram liofilizadas com o objetivo de preservar os tecidos, facilitando seu armazenamento e sua posterior utilização. Para cada espécie de peixe, foram selecionados 10 indivíduos com tamanhos semelhantes e as coletas ocorreram entre os anos de 2012 e 2013. A única exceção ocorreu com a espécie *Micropogonias furnieri*, uma vez que somente 9 indivíduos foram coletados.

As tabelas a seguir apresentam as informações morfométricas dos indivíduos utilizados no presente estudo, assim como as datas das coletas realizadas.

Tabela 1. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Sotalia guianensis*.

Código da Amostra	Comprimento (cm)	Sexo	Local de Coleta	Encalhe/Captura Acidental	Data
SG 01	191	Fêmea	Quissamã	Captura Acidental	09/11/2002
SG 02	182	Macho	Quissamã	Encalhe	05/11/2003
SG 03	177	Fêmea	Quissamã	Encalhe	24/09/2005
SG 04	190	Macho	Quissamã	Captura Acidental	13/02/2006
SG 05	183	Macho	Cabo Frio	Encalhe	21/06/2006
SG 06	188	Macho	Rio das Ostras	Encalhe	26/12/2006
SG 07	168	Fêmea	São João da Barra	Captura Acidental	13/07/2007
SG 08	184	Macho	Rio das Ostras	Encalhe	30/08/2007
SG 09	190	Fêmea	Búzios	Encalhe	27/08/2010
SG 10	201	Fêmea	S. F. do Itabapoana	Encalhe	22/05/2011
SG 11	182	Fêmea	S. F. do Itabapoana	Encalhe	23/08/2011
SG 12	180	Fêmea	S. F. do Itabapoana	Captura Acidental	28/08/2011
SG 13	186	Fêmea	São João da Barra	Encalhe	29/10/2011
SG 14	102	Indeterminado	Quissamã	Captura Acidental	30/01/2013

Tabela 2. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Steno bredanensis*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Encalhe/Captura Acidental</b>	<b>Data</b>
SB 01	267	Fêmea	Búzios	Encalhe	24/06/2005
SB 02	260	Macho	Cabo Frio	Encalhe	30/04/2006
SB 03	240	Macho	Araruama	Encalhe	07/08/2008
SB 04	260	Fêmea	Cabo Frio	Encalhe	04/05/2009
SB 05	200	Indeterminado	Arraial do Cabo	Encalhe	14/11/2010
SB 06	260	Fêmea	Cabo Frio	Encalhe	17/08/2011
SB 07	280	Fêmea	S. F. do Itabapoana	Encalhe	08/09/2011
SB 08	264	Fêmea	Búzios	Captura Acidental	16/09/2011

Tabela 3. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Pontoporia blainvillei*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Encalhe/Captura Acidental</b>	<b>Data</b>
PB 01	144	Fêmea	São João da Barra	Captura Acidental	30/07/2011
PB 02	125	Fêmea	São João da Barra	Captura Acidental	16/01/2012
PB 03	144	Fêmea	Quissamã	Encalhe	24/01/2012
PB 04	136	Macho	Quissamã	Encalhe	09/02/2012
PB 05	122	Macho	Quissamã	Encalhe	09/07/2012
PB 06	113	Fêmea	Quissamã	Encalhe	28/08/2012
PB 07	115	Macho	Quissamã	Captura Acidental	31/08/2012
PB 08	102	Fêmea	Quissamã	Captura Acidental	23/09/2012
PB 09	107	Macho	Quissamã	Captura Acidental	25/09/2012

Tabela 4. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Tursiops truncatus*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Encalhe/Captura Acidental</b>	<b>Data</b>
TT 01	200	Macho	Squarema	Encalhe	07/03/2007
TT 02	250	Fêmea	Arraial do Cabo	Captura Acidental	02/04/2007
TT 03	270	Macho	Cabo Frio	Captura Acidental	24/07/2011
TT 04	280	Macho	Búzios	Captura Acidental	14/08/2012

Tabela 5. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Stenella frontalis*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Encalhe/Captura Acidental</b>	<b>Data</b>
SF 01	198	Fêmea	Búzios	Encalhe	16/10/2003
SF 02	194	Macho	Saquarema	Encalhe	06/07/2004
SF 03	164	Macho	Araruama	Encalhe	28/06/2006
SF 04	200	Fêmea	Araruama	Encalhe	06/08/2008
SF 05	186	Macho	Búzios	Encalhe	31/08/2010
SF 06	166	Macho	Arraial do Cabo	Encalhe	31/07/2012

Tabela 6. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Trichiurus lepturus*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data</b>
PE 01	117	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 02	148	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 03	121	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 04	118	M	Cabo Frio	14/08/2012
PE 05	133	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 06	119	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 07	115	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 08	108	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 09	136	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 10	140	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 11	105	F	Cabo Frio	14/08/2012
PE 12	119	M	Cabo Frio	14/08/2012

Tabela 7. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Micropogonias furnieri*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data</b>
C 01	48	M	Cabo Frio	15/08/2012
C 02	53	M	Cabo Frio	15/08/2012
C 03	50	F	Cabo Frio	15/08/2012
C 04	47	M	Cabo Frio	15/08/2012
C 05	50	F	Cabo Frio	15/08/2012
C 06	57	F	Cabo Frio	15/08/2012
C 07	49	M	Cabo Frio	15/08/2012
C 08	53	M	Cabo Frio	15/08/2012
C 09	47	M	Cabo Frio	15/08/2012

Tabela 8. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Mugil liza*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data</b>
T 01	56	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 02	54	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 03	55	M	Cabo Frio	15/08/2012
T 04	60	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 05	58	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 06	50	M	Cabo Frio	15/08/2012
T 07	54	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 08	57	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 09	57	F	Cabo Frio	15/08/2012
T 10	54	M	Cabo Frio	15/08/2012

Tabela 9. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Sardinella brasiliensis*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data</b>
S 01	24	109	Praia Seca	24/09/2013
S 02	24	113	Praia Seca	24/09/2013
S 03	25	130	Praia Seca	24/09/2013
S 04	26	153	Praia Seca	24/09/2013
S 05	25	129	Praia Seca	24/09/2013
S 06	24	110	Praia Seca	24/09/2013
S 07	25	127	Praia Seca	24/09/2013
S 08	24	120	Praia Seca	24/09/2013
S 09	24	115	Praia Seca	24/09/2013
S 10	25	139	Praia Seca	24/09/2013

Tabela 10. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Scomber japonicus*.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data</b>
CAV 01	31	305	Praia Seca	25/09/2013
CAV 02	32	289	Praia Seca	25/09/2013
CAV 03	30	237	Praia Seca	25/09/2013
CAV 04	28	197	Praia Seca	25/09/2013
CAV 05	27	208	Praia Seca	25/09/2013
CAV 06	30	234	Praia Seca	25/09/2013
CAV 07	31	286	Praia Seca	25/09/2013
CAV 08	30	222	Praia Seca	25/09/2013
CAV 09	27	177	Praia Seca	25/09/2013
CAV 10	29	205	Praia Seca	25/09/2013

Tabela 11. Parâmetros e dados morfométricos dos indivíduos da espécie *Loligo plei*.

Código da Amostra	Comprimento Total (cm)	Comprimento do Manto (cm)	Local de Coleta	Data
L 01	36	16	Cabo Frio	15/08/2012
L 02	33	16	Cabo Frio	15/08/2012
L 03	42	18	Cabo Frio	15/08/2012
L 04	37	17	Cabo Frio	15/08/2012
L 05	41	19	Cabo Frio	15/08/2012
L 06	37	15	Cabo Frio	15/08/2012
L 07	34	17	Cabo Frio	15/08/2012
L 08	42	18	Cabo Frio	15/08/2012
L 09	39	17	Cabo Frio	15/08/2012
L 10	38	17	Cabo Frio	15/08/2012

#### 4.5 Soluções-padrão

Os materiais de referência certificados (MRC) são produtos com ampla estabilidade e suficientemente homogêneos em relação às suas especificações e propriedades, os quais são utilizados para a verificação das exatidões nas medições analíticas, visando garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (Cardoso et al., 2010).

Para análises de PCBs foram utilizados dois diferentes padrões, onde o primeiro deles foi o *PCB Congener Mix for West Coast Fish Studies*, da fornecedora Accustandard, que estava a uma concentração de 1,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  em isooctano e continha uma mistura com 24 congêneres diferentes: PCB-31, -33, -49, -56, -60, -70, -74, -87, -95, -97, -99, -110, -132, -141, -149, -151, -156, -158, -174, -177, -183, -194, -199 e PCB-203. O segundo padrão utilizado (*WHO/NIST/NOAA Congener List*, AccuStandard) estava a uma concentração de 1,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  em isooctano e continha uma mistura com 28 congêneres de PCBs: PCB-8, -18, -28, -44, -52, -66, -77, -81, -101, -105, -114, -118, -123, -126, -128, -138, -153, -156, -157, -167, -169, -170, -180, -187, -189, -195, -206 e PCB-209.

O padrão contendo os congêneres de PBDEs (*Bromodiphenyl Ether Lake Michigan Study*) também se encontrava em isooctano e apresentava concentração

igual a  $1,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para uma mistura contendo sete congêneres: BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154 e -183.

O material de referência para análise de OCPs também foi fornecido pela empresa Accustandard e estava a uma mesma concentração que os anteriores, igualmente em isooctano, e apresentava os seguintes pesticidas: DDTs (o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE e p,p'-DDE), Clordanas ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -clordana, oxiclordana, heptacloro e heptacloro epóxido), HCHs ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -HCH), Clordanas (cis-clordana, trans-clordana, heptacloro e heptacloro epóxido) Drins (aldrin, dieldrin, isodrin e endrin), Endossulfans I e II, HCB, Metoxicloro e Mirex. Ao total são 25 compostos de OCPs.

Como *surrogate* foram utilizadas as soluções de PCB-103 e PCB-198 (Accustandard), ambas a uma concentração de  $1,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  com o propósito de mensurar as perdas ocorridas durante o processo analítico. Por fim, a solução utilizada como padrão interno (PI) para a análise cromatográfica era constituída por TCMX (Accustandard) a uma concentração  $1,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

#### 4.6 Controle de Qualidade

A realização de um controle de qualidade pode assegurar a eficiência das técnicas empregadas na análise dos compostos de interesse, uma vez que garante confiabilidade aos resultados em relação à sua identificação e quantificação através da avaliação da precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade da metodologia adotada (Wade e Cantillo, 1994).

Para o controle de qualidade foram realizados brancos da amostra, os quais são matrizes isentas dos analitos de interesse, as quais são utilizadas com o objetivo de detectar qualquer contaminação associada ao processo analítico que seja capaz de inviabilizar a detecção e a quantificação dos compostos de interesse. Um branco do método aceitável não deve apresentar mais do que 3 interferentes coeluentes aos analitos e seu nível não pode ser mais do que 3 vezes o limite de detecção do método. Os brancos foram injetados no GC-MS após a análise de cada grupo de amostras, ou seja, a cada 10 amostras um branco era injetado.

As curvas analíticas para PCBs, PBDEs e OCPs foram preparadas em n-hexano com as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100, 150 e 200 ng mL<sup>-1</sup>. Foi considerado um coeficiente de linear ( $r^2$ ) igual ou superior a 0,995, visto que quanto mais próximo de 1,0, menos será a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2004).

A recuperação do *surrogate* foi calculada através da equação a seguir:

$$Recup (\%) \textit{ surrogate} = \left[ \frac{Cm_{(S)} \times Ca_{(PI)}}{Cm_{(PI)} \times Ca_{(S)}} \right] \times 100$$

Os termos Cm e Ca significam, respectivamente, “concentração média” e “concentração adicionada”. Já os índices (S) e (PI) significam “*surrogate*” e “Padrão Interno”, respectivamente.

Em todas as análises realizadas, as recuperações dos *surrogates* (PCB-103 e -198) variaram em um intervalo entre 71 e 110%. Se porventura a análise de uma amostra estivesse fora deste intervalo, a mesma era refeita.

Com intuito de avaliar o método para PBDEs, amostras fortificadas (*spiked*) com 20 e 50 ng mL<sup>-1</sup> foram realizadas em algumas amostras e a faixa da recuperação destes encontrou-se entre 81 e 113%.

Os limites de detecção do método (LDM) foram calculados para as 3 classes de compostos de interesse de acordo com as Recomendações para a Definição, Estimativa e Uso do Limite de Detecção do *Analytical Methods Committee* (1987), onde o LDM foi definido pela expressão:

$$LDM = \frac{3s}{S}$$

Onde “s” representa o desvio padrão das medições do branco e “S” é o coeficiente angular do gráfico realizado com os pontos da curva de calibração ou, em outras palavras, é a sensibilidade do método.

Da mesma forma, o limite de quantificação do método foi estimado através da expressão a seguir:

$$LQM = \frac{10s}{S}$$

Os valores encontrados para os LDM e LQM ( $\text{ng g}^{-1}$  peso úmido) para PCB, PBDEs e OCPs encontram-se nas tabelas abaixo:

Tabela 12. LDM e LQM para os congêneres de PCBs ( $\text{ng g}^{-1}$  peso úmido).

Congêneres	LDM	LQM	Congêneres	LDM	LQM
PCB 8	0,38	1,69	PCB 153	0,38	1,69
PCB 18	0,43	1,92	PCB 132	0,58	2,60
PCB 31	0,48	2,13	PCB 105	0,51	2,27
PCB 28	0,49	2,20	PCB 141	0,44	1,98
PCB 33	0,41	1,83	PCB 138	0,46	2,05
PCB 52	0,54	2,43	PCB 158	0,53	2,39
PCB 49	0,48	2,13	PCB 126	0,66	2,98
PCB 44	0,58	2,59	PCB 187	0,77	3,45
PCB 74	0,49	2,20	PCB 183	0,75	3,37
PCB 70	0,52	2,31	PCB 128	0,45	2,00
PCB 66	0,57	2,55	PCB 167	0,72	3,23
PCB 95	0,54	2,43	PCB 174	0,71	3,16
PCB 56/60	0,41	1,85	PCB 177	0,56	2,50
PCB 101	0,30	1,36	PCB 156	0,59	2,66
PCB 99	0,58	2,62	PCB 157	0,73	3,28
PCB 97	0,46	2,05	PCB 180	0,62	2,76
PCB 81	0,52	2,31	PCB 169	0,53	2,38
PCB 87	0,41	1,85	PCB 170	0,53	2,39
PCB 77	0,51	2,30	PCB 201	0,58	2,62
PCB 110	0,48	2,17	PCB 203	0,63	2,83
PCB 151	0,60	2,67	PCB 189	0,60	2,71
PCB 123	0,50	2,25	PCB 195	1,01	4,53
PCB 149	0,58	2,59	PCB 194	1,09	4,89
PCB 118	0,56	2,50	PCB 206	1,02	4,59
PCB 114	0,43	1,91	PCB 209	0,74	3,31

Tabela 13. LDM e LQM para os congêneres de PBDEs ( $\text{ng g}^{-1}$  peso úmido).

Congêneres	LDM	LQM
BDE 28	0,86	3,85
BDE 47	0,82	3,66
BDE 100	0,81	3,62
BDE 99	0,76	3,40
BDE 154	0,80	3,59
BDE 153	0,85	3,81
BDE 183	1,06	4,75

Tabela 14. LDM e LQM para os pesticidas organoclorados (OCPs) (ng g<sup>-1</sup> peso úmido).

OCPs	LDM	LQM
a-HCH	0,31	1,40
HCB	0,30	1,36
b-HCH	0,43	1,91
g-HCH	0,36	1,63
d-HCH	0,41	1,82
Heptacloro	0,22	0,97
Aldrin	0,22	0,99
Isodrin	0,33	1,48
Heptacloro Ep.A	0,42	1,88
Oxiclordana	0,47	2,12
Heptacloro Ep.B	0,41	1,86
g-Clordana	0,34	1,54
op'-DDE	0,19	0,87
Endossulfan I	0,27	1,21
a-Clordana	0,45	2,00
Dieldrin	0,23	1,03
pp'-DDE	0,27	1,20
op'-DDD	0,20	0,91
Endrin	0,28	1,23
Endossulfan II	0,42	1,88
pp'-DDD	0,29	1,31
op'-DDT	0,31	1,39
pp'-DDT	0,28	1,24
Metoxicloro	0,32	1,44
Mirex	0,41	1,84

## 4.7 Análise Química

Inicialmente, as amostras liofilizadas foram trituradas e homogeneizadas em um gral de porcelana com auxílio de um pistilo ou em um liquidificador de vidro e armazenadas em frascos âmbar.

A metodologia para a determinação simultânea de PCBs, PBDEs e OCPs foi desenvolvida anteriormente no Laboratório Especializado em Meio Ambiente da PUC-Rio (LEMA) (Da Silva, 2009; Quinete, 2010b; Lavandier, 2011) e foi baseada em outros estudos previamente reportados (Allchin et al., 1999; De Boer et al., 2001; Zhu e Hites, 2003). Esta metodologia utilizada possui 3 etapas principais: extração, clean-up e análise cromatográfica.

A técnica de extração através do Ultra Turrax (modelo T18 basic, IKA® do Brasil) foi escolhida em função de sua eficiência na trituração de fibras e tecidos biológicos, a qual otimiza o processo de extração e faz com que o mesmo ocorra em um tempo muito menor do que as demais metodologias. Este método extrai simultaneamente PCBs, PBDEs e OCPs com base em suas similaridades estruturais, as quais permitem que estes compostos se comportem de forma semelhante em diferentes solventes orgânicos (Da Silva, 2009).

Aproximadamente 1,0 g da amostra liofilizada foi previamente pesado e, em seguida, 100 µL de cada surrogate (PCB-103 e PCB-198) foram adicionados, ambos a uma concentração de 1,0 ng µL<sup>-1</sup>.

À mistura citada acima foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e este sistema foi levado ao Ultra Turrax durante um minuto a uma frequência de rotação de 14.000 rpm. Logo em seguida, 20 mL de acetona foram adicionados ao sistema e o mesmo foi levado novamente ao Ultra Turrax por um minuto e à mesma frequência de rotação citada anteriormente. Então, 20 mL de n-hexano foram adicionados ao sistema e a mistura foi levada ao Ultra Turrax sob as mesmas condições anteriores. Por fim, 20 mL de água Ultra Pura foram adicionados ao sistema e o mesmo foi levado ao Ultra Turrax por um minuto a uma frequência de 22.000 rpm. Ao final deste procedimento, a mistura foi deixada em repouso no refrigerador por, aproximadamente, uma hora para que as fases fossem totalmente separadas.

Após a decantação do sistema, a fase orgânica foi separada com auxílio de uma pipeta pasteur preenchida com 1,0 mL de sulfato de sódio anidro e transferida para um béquer. Em seguida, esta fase orgânica foi concentrada até um volume de 4,0 mL em um fluxo de nitrogênio de alta pureza e transferida para um vial.

Então, este extrato foi novamente concentrado até um volume de 1,0 mL para a realização do clean up com ácido sulfúrico, o qual tem por objetivo quebrar os resíduos lipídicos presentes na amostra. Sendo assim, foram inseridos 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado ao vial contendo o extrato e a mistura foi levada ao vórtex para uma agitação vigorosa. Esta agitação produz uma emulsão que demora em torno de 48 horas para que as fases sejam separadas. Entretanto, ao levar a mistura à centrífuga, este tempo foi reduzido para 2 horas.

A fase orgânica (extrato em n-hexano) foi transferida para outro vial com auxílio de uma pipeta pasteur e “lavada” duas vezes com água Ultra Pura (purificada cinco vezes com 20 mL de n-hexano para cada dois litros de água).

Após os procedimentos anteriores, o extrato foi evaporado até a secura em banho-maria controlado a 40 °C e sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza e rapidamente ressuspensionado em 900 µL de hexano. Finalmente, foram adicionados 100 µL da solução de TCMX (Padrão Interno) a uma concentração de 1,0 ng µL<sup>-1</sup>, totalizando um volume final de 1,0 mL.

#### 4.8

#### **Determinação do teor lipídico nas amostras**

A metodologia utilizada para a realização desta determinação foi baseada em um método clássico de extração por solventes orgânicos, conhecido como “Método Bligh-Dyer” (Bligh e Dyer, 1959), com algumas alterações propostas por Honeycutt et al. (1995). Assim, para uma extração lipídica eficiente se faz necessária a realização de uma mistura de solventes que contenham polaridade suficiente para remover os lipídios de suas associações com membranas e lipoproteínas.

Inicialmente, 1,0 g de amostra seca e triturada é misturado com 30 mL de acetona e o sistema é levado ao Ultra Turrax por cerca de um minuto a uma

frequência de rotação de 14.000 rpm. Em seguida, são adicionados ao sistema 30 mL de n-hexano e a mistura é encaminhada ao Ultra Turrax sob as mesmas condições anteriores. Com isso, esta associação entre amostra triturada e solventes orgânicos proporciona a formação de uma monofase, na qual os lipídios já se encontram removidos dos constituintes celulares.

Finalmente, o término deste procedimento se dá com a inserção de uma solução saturada de cloreto de sódio, preparada em água Ultra Pura, ao sistema e o mesmo é levado ao Ultra Turrax a uma frequência de rotação de 22.000 rpm por um minuto. Desta maneira, há formação de duas fases, onde a superior (fase orgânica) contém os lipídios em questão. A mistura foi, então, levada ao repouso por cerca de uma hora para a completa decantação do sistema e separação das fases. Feito isso, a camada orgânica foi totalmente transferida para um béquer, previamente pesado.

O solvente foi evaporado sob um leve fluxo de nitrogênio de alta pureza e o extrato obtido foi levado à secura na estufa a uma temperatura entre 75 e 85 °C por 48 horas e até peso constante.

#### **4.9 Análise Cromatográfica**

Os PCBs e PBDEs foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS – Agilent Technologies 5973n) com impacto de elétrons (EI), que operava em modo de monitoramento seletivo de íons (*SIM – Selected ion monitoring*) (70 eV). A coluna utilizada foi a HP 5MS (Agilent), que possui 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxano. O gás de arraste era o hélio, com um fluxo constante de 1,1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 1 µL no modo sem divisão de fluxo (*splitless*). As temperaturas no GC-MS para o injetor, interface e fonte de íons foram, respectivamente, 280 °C, 280 °C e 300 °C.

As condições para a determinação dos PCBs foram as seguintes: a rampa de temperatura utilizada na separação destes analitos teve início em 75 °C, permanecendo assim por 3 minutos, até a sua elevação a uma taxa de 15 °C min<sup>-1</sup>

até alcançar a temperatura de 150 °C. Ao atingir esta temperatura, a mesma voltou a ser elevada a uma taxa de 2 °C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 260 °C. Por fim, a temperatura foi elevada até 300 °C a uma taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo estável por 10 minutos.

Para análise dos PBDEs, a rampa de temperatura foi iniciada a uma temperatura de 70 °C e permaneceu assim por 1 minuto. Logo em seguida, a mesma foi elevada a uma taxa de 12 °C min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura de 154 °C. Ao atingir esta temperatura, a mesma foi novamente elevada a uma taxa de 2 °C min<sup>-1</sup> até 210 °C e, finalmente, elevada até 300 °C a uma taxa de 3 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo constante por 5 minutos.

Os OCPs foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de captura de elétrons (GC-ECD – Agilent 6890). A coluna utilizada foi a HP 5MS (Agilent), que possuía 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,50 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxano. O gás de arraste era o hidrogênio, cuja pressão era de 13,00 psi. A rampa de temperatura teve início em 70 °C e permaneceu nesta condição por 1 minuto. Logo em seguida, a temperatura foi elevada até 170 °C a uma taxa de 40 °C min<sup>-1</sup>. Alcançada esta temperatura, a mesma foi novamente elevada a uma taxa de 1,5 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C e permaneceu nesta condição por 2 minutos. Por fim, a uma taxa de 15 °C min<sup>-1</sup>, a temperatura foi elevada até 300 °C e permaneceu desta forma por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 280 °C e 320 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás auxiliar (*makeup*), com fluxo de 60 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado foi de 2 µL no modo sem divisão de fluxo (*splitless*).

#### **4.10** **Determinação dos isótopos estáveis**

As concentrações elementares e razões isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) foram obtidas através da utilização do Espectrômetro de Massa Isotópica Thermo Finnigan Delta V Advantage acoplado com o Analisador Elementar Flash 2000 (Organic Elemental Analyzer - Thermo Scientific). Os compostos orgânicos

foram oxidados na presença de oxigênio com alto grau de pureza e de um catalisador e posteriormente os mesmos foram transformados em CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

Estes gases são separados em linha por cromatografia antes da análise elementar isotópica, a qual também ocorre em linha (Cloern et al., 2002). As concentrações de carbono e nitrogênio elementar são expressas em percentual (%), sendo a precisão obtida através de três repetições, a cada grupo de vinte amostras. A precisão obtida foi acima de 95% e o limite de detecção para carbono e nitrogênio foram 0,05% e 0,02%, respectivamente. Os resultados de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  são obtidos inicialmente através da relação com os padrões de trabalho para depois serem expressos em relação ao carbonato da formação Pee Dee (Belamite) para  $\delta^{13}\text{C}$  e em relação ao N<sub>2</sub> atmosférico para  $\delta^{15}\text{N}$ . A precisão da análise foi de 0,1‰.

#### 4.11 Identificação dos PCBs e PBDEs

A identificação de PCBs, PBDEs e OCPs foi realizada mediante a comparação entre as ordens de eluição e os tempos de retenção destes compostos e os respectivos parâmetros dos padrões Accustandard.

Os congêneres de PCBs e PBDEs foram caracterizados pela identificação dos íons específicos formados na quebra realizada no espectrômetro de massas operado em modo de monitoramento seletivo de íons. As tabelas a seguir apresentam os íons característicos para a quantificação de PCBs e PBDEs.

Tabela 15. Íons monitorados dos PCBs em função do seu grau de halogenação.

GRAU DE HALOGENAÇÃO	CONGÊNERES	ÍON DE QUANTIFICAÇÃO	ÍON SECUNDÁRIO	ÍON TERCIÁRIO
Cl 2	PCB 04-15	222	224	226
Cl 3	PCB 16-39	255,95	257,95	259,95
Cl 4	PCB 40-81	291,9	289,9	293,9
Cl 5	PCB 82-127	325,9	323,9	327,9
Cl 6	PCB 128-169	359,9	362,9	363,9
Cl 7	PCB 170-193	393,8	395,8	397,8
Cl 8	PCB 194-205	429,75	427,75	431,75
Cl 9	PCB 206-208	463,7	427,7	465,7
Cl 10	PCB 209	487,7	499,7	495,7

Tabela 16. Íons monitorados dos PBDEs em função do seu grau de halogenação.

GRAU DE HALOGENAÇÃO	CONGÊNERES	ÍON DE QUANTIFICAÇÃO	ÍON SECUNDÁRIO	ÍON TERCIÁRIO
Br 1	BDE 01-03	248	250	–
Br 2	BDE 04-15	327,9	325,9	329,9
Br 3	BDE 16-39	405,8	407,8	409,8
Br 4	BDE 40-81	485,7	483,7	487,7
Br 5	BDE 82-127	536,6	565,6	561,6
Br 6	BDE 128-169	643,55	641,55	645,5
Br 7	BDE 170-193	721,45	723,45	719,45

#### **4.12**

### **Análise Estatística**

Inicialmente, foram realizados testes de Shapiro-Wilk, teste W, com intuito de avaliar a normalidade da distribuição dos dados obtidos no presente estudo. Como esperado, os dados apresentaram uma distribuição não normal e as diferenças entre os grupos foram testadas através da análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. Além disso, os testes não paramétricos de Spearman foram realizados para investigar possíveis correlações entre PCBs, PBDEs e OCPs e as variáveis morfométricas dos indivíduos coletados. O nível de significância adotado ao longo de todas estas análises foi de 95% ( $p < 0,05$ ).