



Thaís de Almeida Pedrete

**Avaliação da esponja *Hymeniacidon
heliophila* (Porifera: Halichondrida)
como biomonitora para HPAs e uso
de biomarcadores para verificar
a toxicidade**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica pelo Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadora: Profa. Angela de Luca Rebello Wagener
Coorientadora: Profa. Adriana Haddad Nudi

Rio de Janeiro
Abril de 2013



Thaís de Almeida Pedrete

**Avaliação da esponja *Hymeniacidon
heliophila* (Porifera: Halichondrida)
como biomonitora para HPAs e uso
de biomarcadores para verificar
a toxicidade**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Química –
Química Analítica pelo Programa de Pós-
graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada
pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Angela de Luca Rebello Wagener

Orientadora

Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Adriana Haddad Nudi

Coorientadora

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Cristiano Carvalho Coutinho

UFRJ

Dr. Josino Costa Moreira

Fiocruz

Dra. Daniela Corneli Batista da Silva

Departamento de Química – PUC-Rio

Dra. Rachel Ann Hauser-Davis

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 24 de abril de 2013

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem a autorização da universidade, da autora e do orientador.

Thaís de Almeida Pedrete

Graduou-se em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) em 2010 pela Universidade Santa Úrsula (USU). Participou de inúmeras atividades na área de meio ambiente e possui experiência em monitoramento ambiental e ensaios de toxicidade.

Ficha Catalográfica

Pedrete, Thaís de Almeida

Avaliação da esponja *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) como biomonitora para HPAs e uso de biomarcadores para verificar a toxicidade / Thaís de Almeida Pedrete ; orientadora: Angela de Luca Rebello Wagener ; co-orientadora: Adriana Haddad Nudi. – 2013.

181 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2013.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Biomarcadores. 3. HPAs. 4. Bioensaios. 5. Toxicidade. 6. *Hymeniacidon heliophila*. I. Wagener, Angela de Luca Rebello. II. Nudi, Adriana Haddad. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

A Deus por ter iluminado a minha vida e por ter
me abençoado, aos meus pais que me ensinaram
a batalhar sempre pelos meus ideais e ao meu
marido por me fazer acreditar em mim.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Angela Wagener pelo incentivo, pela orientação, pelas suas palavras sábias que ajudaram bastante no desenvolvimento deste trabalho, por todas as vezes que pode dedicar seu tempo ao meu trabalho e pela clareza e objetividade na interpretação dos resultados.

À minha coorientadora Prof^a Adriana Nudi pela compreensão, pela amizade por todos os anos de convívio, por estar sempre solícita em me ajudar, pela praticidade (eu não tenho), pelos puxões de orelha e por sempre afirmar de que tudo vai dar certo.

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, que possibilitaram a viabilidade deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e irmã por tudo que fizeram por mim em toda minha existência, por acreditarem na minha capacidade, pelo carinho e apoio, por todos os momentos juntos e felizes, pela bagunça que sempre fazemos quando no juntamos e por terem cuidado da caçulinha da família, eu.

Ao meu querido Carlos, marido e melhor amigo, pela super paciência com a minha TPM (Tensão Pré-Mestrado), por não termos começado a 3ª Guerra Mundial, já que você também defende tese, pelos incansáveis mapas, por toda ajuda para o andamento deste trabalho, principalmente nas idas ao laboratório aos sábados para montar coluna comigo, por ser companheiro em todas as horas e por fazer parte da minha vida, agora para sempre.

Ao Prof^o Cristiano Coutinho pela super, hiper, mega, ultra ajuda nos bioensaios, disponibilizando o espaço do seu laboratório para realizá-los e nas análises histológicas e por suas explicações sobre as esponjas.

À Dra. Daniela Batista pela enorme ajuda nas coletas, pelos seus conhecimentos sobre as esponjas e pela ajuda durante os bioensaios.

À Dra. Rachel Davis pelo seu entusiasmo em querer trabalhar com esponjas, estando sempre à disposição e pela ajuda com as análises de glutatona.

Ao Dr. Josino Moreira por ter participado da banca, e que seja um início de uma longa colaboração.

Ao Prof^o Arthur Scofield pela sua sabedoria e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos.

À Carlinha, companheira de profissão, pelo carisma e alegria, por estar sempre disponível em colaborar e por todos os ensinamentos conduzidos desde a época de estagiária.

À Núbia e ao Gton pela paciência e ajuda no processamento das amostras no CG e pelo ótimo convívio.

Ao Felipe, Celso e à Ivy e Lilian pela ajuda solícita, sempre que eu precisava de um favorzinho e pela descontração durante o dia.

Aos estagiários “emprestados” Caroline, Larissa, Felipe II e Henrique pela ajuda essencial na bancada, principalmente as meninas pelo ótimo e rápido trabalho com os cortes histológicos.

À Letícia, Cris, Laura e ao Ricardo, pelo convívio e um excelente ambiente de trabalho.

Ao Departamento de Química da PUC-Rio.

À minha querida Fátima Almeida por estar sempre disposta em me ajudar, pelo carinho, pela atenção e muita paciência.

Aos meus sogros pelo carinho e ajuda, mesmo com a implicância e “elogios” por parte do meu sogrinho, mas sei que no fundo do coração gosta de mim.

A todos os meus familiares e agregados pelo apoio, por terem criado uma boa expectativa sobre o meu estudo e pelas alegrias e bagunça que a família “Tufão” proporcionou.

Às amicíssimas Deh, Lú, Gi, Dami e Tia Carol pela eterna amizade e apoio, pelo nosso “girl’s night out”, pelos ótimos momentos que passamos juntas nestes anos de convívio e pela felicidade que me proporcionam fazendo parte da minha vida.

A todos que de certa forma contribuíram para o andamento e conclusão do trabalho.

Resumo

Pedrete, Thaís de Almeida; Wagener, Angela de Luca Rebello (orientadora). **Avaliação da esponja *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) como biomonitora para HPAs e uso de biomarcadores para verificar a toxicidade.** Rio de Janeiro, 2013. 181p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A espécie de esponja *Hymeniacidon heliophila* foi utilizada para avaliar a cinética de incorporação e eliminação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus efeitos nas células da esponja, compreendendo as variáveis que as condicionam, monitorando-a em campo e em laboratório. Amostras de esponjas e água foram coletadas na Urca, Praça XV e Itaipu, para a realização do biomonitoramento passivo. Amostras de Itaipu (influência petrogênica) apresentaram menor contaminação de HPAs e aquelas da Praça XV (influência pirogênica) apresentaram a maior concentração destes compostos. Bioensaios de depuração e de acumulação foram realizados na esponja *H. heliophila* para avaliar a toxicidade de HPAs. No ensaio de depuração, esponjas da Baía de Guanabara foram transferidas para sete aquários, contendo três indivíduos cada. Esponjas foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 168, 240 e 336 h. O $\Sigma 38\text{HPAs}$ reduziu de 1678,9 (T0) para 928,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (T336). Nenhuma depuração ocorreu em 96 h. Decréscimo da concentração foi observado depois disso, a uma taxa de $2,6 \approx \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Não foram observadas alterações nos biomarcadores de efeito. No bioensaio de acumulação, esponjas de Itaipu, uma área controle, foram expostos a criseno ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) em quatro aquários, contendo um indivíduo cada. Esponjas foram coletadas em 24, 48, 72 e 96 h. Também foram retiradas partes de um único espécime de esponja nestes intervalos, para avaliar resposta do mesmo indivíduo ao longo do experimento. A acumulação foi intensa no período de 72 h, seguido por um declínio em T96 em indivíduos diferentes, com uma taxa de acumulação

de $\approx 250 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O tempo de retenção do vermelho neutro reduziu, em consequência, foi correlacionado com a acumulação de criseno, indicando uma redução da saúde das células. A glutathione (GSH) aumentou em diferentes indivíduos, e a concentração do criseno diminuiu com a elevada expressão desta proteína, possivelmente, através da conjugação. No mesmo indivíduo, a GSH diminuiu, provavelmente, pelo esforço de reconstrução do tecido retirado. Análises histológicas não foram correlacionadas à concentração dos HPAs em ambos os experimentos, mas podem ser utilizadas como indicativo da saúde das esponjas durante o bioensaio, uma vez que o tecido destes organismos contraiu-se, desorganizando os canais aquíferos e redistribuindo o colágeno pelo tecido. Ensaio de micronúcleo não foi bem sucedido devido à forte associação de células. *H. heliophila* mostrou ser um biomonitor apropriado para os HPAs por ser resistente a elevadas concentrações e por apresentar capacidade de acumular rapidamente e eliminar HPAs.

Palavras-chave

Biomarcadores; HPAs; bioensaios; toxicidade; *Hymeniacidon heliophila*.

Abstract

Pedrete, Thaís de Almeida; Wagener, Angela de Luca Rebello (advisor). **Evaluation of the sponge *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) as biomonitor of PAHs and use of biomarkers to verify expression of toxicity.** Rio de Janeiro, 2013. 181p. MSc. Dissertation – Departamento de Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The species of sponge *Hymeniacidon heliophila* was used to evaluate the kinetics of PAHs uptake and elimination and their effects on the sponge cells, comprising the variables that affect these processes, monitoring them in the field and in the laboratory. Sponges and water samples were collected from Urca, Praça XV and Itaipu, for the realization of passive biomonitoring. Itaipu (petrogenic influence) samples showed lower contamination of PAHs and those of Praça XV (pyrogenic influence) had the highest concentration of these compounds. Depuration and accumulation bioassays were carried out in the sponge *H. heliophila* to evaluate toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In the depuration assay, sponges from Guanabara Bay were transferred to seven aquaria, containing three individuals each. Sponges were collected at 24, 48, 72, 96, 168, 240 and 336 h. The $\Sigma 38$ PAHs varied from 1678.9 (T0) to 928.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (T336). No depuration occurred in 96h. Declines in concentration were observed thereafter, at a rate of $\approx 2.6 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$. No changes were noticed in effect biomarkers. In the accumulation bioassay, sponges from Itaipu beach, a control area, were exposed to chrysene ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) in four aquaria, containing one individual each. Sponges were collected at 24, 48, 72 and 96 h. Parts of a single specimen were removed at all intervals to assess response of the same individual throughout the experiment. Accumulation was intense in the period of 72 h, followed by a decline at T96, with accumulation rate of $\approx 250 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$. The retention time of the neutral red reduced, consequently it was correlated to the chrysene accumulation, indicating a reduction of the cell health. Glutathione

(GSH) increased in different individuals and chrysene concentration reduced with the increment of this protein, possibly, through conjugation. In the same individual, GSH decreased, probably, for the effort to rebuild the tissue removed. Histological evaluations were not correlated to PAHs concentration in both experiments, but they can be used as biomarkers of the sponge health during bioassay, since, sponges contracted their tissue, disorganizing the channel aquifers and redistributing the collagen in the tissue. Micronucleus assay was not successful due to strong cell association. The *H. heliophila* showed to be a suitable biomonitor to PAHs for being resistant to high concentrations and to present ability of accumulating rapidly and eliminate PAHs.

Keywords

Biomarkers; PAHs; bioassays; toxicity; *Hymeniacidon heliophila*.

Sumário

1	Introdução	23
1.1.	Objetivos	24
1.1.1.	Objetivos Específicos	24
2	Revisão Bibliográfica.....	25
2.1.	Ecotoxicologia.....	25
2.2.	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	27
2.2.1.	Origem e fontes	29
2.2.1.1.	Naturais	30
2.2.1.2.	Antrópicas	30
2.2.2.	Propriedades físico-químicas	31
2.2.3.	Dinâmica e distribuição dos HPAs nos ambientes aquáticos	34
2.2.3.1.	Foto-oxidação e (bio)degradação dos HPAs.....	35
2.2.4.	Dinâmica e efeitos dos HPAs em organismos marinhos	37
2.2.4.1.	Metabolização dos HPAs	38
2.2.4.2.	Efeitos	40
2.3.	Biomonitoramento.....	43
2.3.1.	Biomarcadores	43
2.3.1.1.	Compostos policíclicos aromáticos.....	45
2.3.1.2.	Vermelho neutro.....	45
2.3.1.3.	Micronúcleo	48
2.3.1.4.	Glutathiona	49
2.3.1.5.	Histologia.....	52
2.3.2.	Filo Porifera	54
2.3.2.1.	Escolha das esponjas como bioindicadoras.....	56
2.3.2.2.	Espécie estudada	58

3 Área de Estudo	59
3.1. Baía de Guanabara.....	59
3.2. Itaipu	64
4 Materiais e Métodos	66
4.1. Materiais empregados	66
4.2. Biomonitoramento passivo com a esponja <i>Hymeniacidon</i> <i>heliophila</i> da Baía de Guanabara	67
4.2.1. Amostragem de água	68
4.2.2. Procedimento de coleta da esponja <i>H. heliophila</i>	69
4.2.3. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em tecido de <i>H. heliophila</i> por CG/EM	69
4.2.3.1. Extração e teor de lipídios	69
4.2.3.2. <i>Clean up</i> lipídios.....	70
4.2.3.3. Fracionamento dos compostos aromáticos	72
4.2.3.4. Quantificação.....	73
4.2.4. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água por CG/EM	75
4.2.4.1. Extração	75
4.2.4.2. Fracionamento dos compostos aromáticos e quantificação	76
4.3. Biomonitoramento ativo com a esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i> ...	76
4.3.1. Amostragem de água e parâmetros físico-químicos	78
4.3.1.1. Parâmetros físico-químicos	78
4.3.2. Amostragem e tratamento das amostras de filtro	79
4.3.3. Amostragem e preparação das amostras de <i>H. heliophila</i>	80
4.3.4. Bioensaios.....	81
4.3.4.1. Depuração.....	81
4.3.4.2. Acumulação.....	82
4.3.5. Biomarcadores celulares e histológicos	84
4.3.5.1. Extração celular.....	84
4.3.5.2. Ensaio do vermelho neutro.....	86
4.3.5.3. Ensaio do micronúcleo	87
4.3.5.4. Glutathiona	88

4.3.5.5. Histologia.....	89
4.4. Tratamento estatístico	91
5 Resultados e Discussão.....	92
5.1. Biomonitoramento passivo com a esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i>	92
5.1.1. Análise de HPAs em amostras de água da Baía de Guanabara	92
5.1.2. Teor de lipídios e análise de HPAs em esponja	95
5.2. Biomonitoramento ativo com a esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i> .	101
5.2.1. Depuração.....	101
5.2.1.1. Concentração de HPAs em amostras de água e filtro	101
5.2.1.2. Teor de lipídios e concentração de HPAs em esponja	102
5.2.2. Acumulação.....	111
5.2.2.1. Concentração de HPAs em amostras de água e filtro	111
5.2.2.2. Teor de lipídios e concentração de HPAs em esponja	113
5.2.3. Biomarcadores	118
5.2.3.1. Vermelho Neutro	118
5.2.3.2. Micronúcleo	121
5.2.3.3. Glutathiona	121
5.2.3.4. Análises histológicas	124
5.3. Comparação entre os biomonitoramentos	132
6 Conclusões	144
7 Referências Bibliográficas.....	147
Anexos	164

Lista de abreviaturas

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

EPA – *Environmental Protection Agency*

MN - Micronúcleo

VN – Vermelho neutro

GSH – Glutathiona

HE – Hematoxilina/eosina

BG – Baía de Guanabara

CG EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

F1 - Fração alifática

F2 – Fração aromática

GPC– *Gel Permeation Chromatography*

PTFE - politetrafluoretileno

N₂ – Nitrogênio

PI – Padrão Interno

***p*-terfenil-d₁₄** – *para*-terfenil_deuterado₁₄

Naf-d₈ – Naftaleno-deuterado₈

Ace-d₁₀ – Acetileno_deuterado₁₀

Fen-d₁₀ – Fenantreno_deuterado₁₀

Peril-d₁₂ – Perileno_deuterado₁₂

Cris-d₁₂ – Criseno_deuterado₁₂

Hepes – ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

DMSO – dimetilsulfóxido

CaCl₂ – cloreto de cálcio

NaCl – cloreto de sódio

KCl – cloreto de potássio

MnCl₂.4H₂O – cloreto de manganês tetrahidratado

Na₂SO₄ – sulfato de sódio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

KI – iodeto de potássio

KIO₃ – iodato de potássio

KOH – hidróxido de potássio

NaOH – hidróxido de sódio

Na₂S₂O₃.5 H₂O – tiosulfato de sódio pentahidratado

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

min – minuto(s)

s - segundo(s)

h – hora(s)

FA – fator de acumulação

Lista de figuras

Figura 2.1 Cadeia da causalidade indicando a sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia (adaptado de Costa <i>et al.</i> , 2008).	25
Figura 2.2 Níveis de organização nos quais podem se manifestar os efeitos de agentes tóxicos e tempo de duração da resposta (Zagatto & Bertoletti, 2011).	26
Figura 2.3 Estruturas moleculares dos 16 HPAs prioritários da USEPA.	28
Figura 2.4 Fontes de hidrocarbonetos naturais e antropogênicas (Fingas, 2001).	29
Figura 2.5 Abundância relativa de compostos parentais e alquil-substituídos como influência da temperatura de formação (modificado de NRC, 1985, <i>apud</i> Massone, 2004).	31
Figura 2.6 Alterações dos HPAs no meio ambiente (Lima, 1996).	34
Figura 2.7 Biodegradação do criseno pelo fungo <i>Fusarium sp.</i> (modificado de Hidayat <i>et al.</i> , 2012).	36
Figura 2.8 Biotransformação de xenobióticos (modificado de Manahan, 1992).	39
Figura 2.9 Cinética, biodisponibilidade e efeitos gerados pela exposição de contaminantes (adaptado de Fent, 2003).	41
Figura 2.10 Região de “baía” de certos HPAs.	41
Figura 2.11 Diferenças entre os biomarcadores (Schlenk, 1999).	44
Figura 2.12 Estrutura do vermelho neutro.	46
Figura 2.13 Etapas do ensaio do vermelho neutro: 1) concentração do vermelho neutro dentro dos compartimentos lisossomais; 2) aumento dos volumes destes compartimentos e difusão do corante para o citosol; 3) alteração na forma das células; 4) alterações estruturais na célula (Lima, 2001).	47
Figura 2.14 Mecanismo de formação do micronúcleo em uma célula mononucleada (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).	49
Figura 2.15 Estrutura e molécula de glutathiona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (modificado de Meister & Anderson, 1983).	50

Figura 2.16 Esquema do ciclo catalítico da glutatona (Rover Júnior <i>et al.</i> , 2001).	51
Figura 2.17 Sistema aquífero. (1) Filtração pela corrente produzida pelos coanócitos; (2) captura pelos coanócitos do alimento adsorvido na partícula (Porífera Brasil).	53
Figura 2.18 Estrutura interna de uma esponja e os principais constituintes: ES- espícula; PI – pinacócitos; AR – arqueócitos; CO – coanócitos; CC – câmaras coanocitárias (modificado de Exposito <i>et al.</i> , 2001).	54
Figura 2.19 Tipos de espículas. (A) monoaxônica; (B) triaxônica; (C) tetraxônica; (D) hexactinal. (Brusca & Brusca, 2003).	55
Figura 2.20 Espécime de <i>Hymeniacidon heliophila</i> (Parker, 1910). Foto: T. Pedrete.	58
Figura 3.1 Localização da Baía de Guanabara.	60
Figura 3.2 Caracterização das águas da Baía de Guanabara (adaptado de Mayr, 1998): 1 - Canal principal de navegação – melhores condições de qualidade de água em função da grande contribuição oceânica; 2 - Entrada da baía – cidades do Rio de Janeiro e Niterói, com poluição doméstica; 3 - Caracterizada por forte deterioração ambiental; 4 - Seção nordeste – região de aporte de rios menos poluídos; 5 - Seção noroeste – área mais deteriorada em função das diversas fontes de poluição.....	61
Figura 3.3 Fontes de contaminação na Baía de Guanabara (adaptado de JICA, 1994).	63
Figura 3.4 Localização da região costeira de Itaipu.	65
Figura 4.1 Locais de coleta da estação chuvosa. A – Itaipu; B – Praça XV; C – Urca.	67
Figura 4.2 Diagrama de tratamento das amostras de esponjas e água. ..	68
Figura 4.3 Extração das amostras de esponja em Soxhlet por 24h. Foto: T. Pedrete.	70
Figura 4.4 Procedimento de coluna grossa. Foto: T. Pedrete.	71
Figura 4.5 Fracionamento dos compostos em coluna de sílica-gel. Foto: T. Pedrete.	73
Figura 4.6 Cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas. Foto: T. Pedrete.....	74

Figura 4.7 Procedimento de extração de amostra de água de 4L. Foto: T. Pedrete.....	76
Figura 4.8 Pontos de coleta para os bioensaios. (A) Urca; (B) Itaipu. Fotos: T. Pedrete.....	77
Figura 4.9 Etapas de tratamento das diferentes matrizes. (1) surrogate F2; (2) PI F2.	77
Figura 4.10 Sistema de filtração de água para material particulado. Foto: T. Pedrete.	79
Figura 4.11 Limpeza (A) e medidas morfométricas (B) e (C) da esponja <i>H. heliophila</i> . Fotos: T. Pedrete.....	80
Figura 4.12 Esponjas distribuídas nos aquários. Foto: T. Pedrete.	82
Figura 4.13 Ensaio de acumulação do criseno em esponjas. Foto: T. Pedrete.....	84
Figura 4.14 Corte da esponja em meio salino. Foto: T. Pedrete.	85
Figura 4.15 Extração celular em meio salino. Foto: T. Pedrete.....	85
Figura 4.16 Etapas do ensaio do micronúcleo: 1 - Espalhamento da suspensão celular na lâmina; 2 - Câmara úmida; 3 - Fixação; 4 - Coloração. Fotos: T. Pedrete.	87
Figura 5.1 Distribuição de HPAs e leves e pesados nos locais de amostragem de água. A – 16 HPAs; B- 38 HPAs.	94
Figura 5.2 Correlação entre teor de lipídios e concentração dos HPAs em Itaipu.....	95
Figura 5.3 Distribuição de HPAs e leves e pesados nos locais de amostragem de esponja para o biomonitoramento passivo e ativo. (A) 16 HPAs; (B) 38 HPAs.	98
Figura 5.4 Log-log plot da soma dos HPAs de alto e baixo peso molecular. EI – esponja Itaipu; EPXV – esponja Praça XV; EU – esponja Urca; AI – água Itaipu; APXV – água Praça XV; AU – água Urca.....	99
Figura 5.5 Variação na tipologia dos HPAs em esponjas coletadas em Itaipu (A), Praça XV (B) e Urca (C) para o biomonitoramento passivo...	100
Figura 5.6 Tipologia dos HPAs em amostras de campo de água e filtro.....	102
Figura 5.7 Correlação entre teor de lipídios e concentração dos HPAs no tecido.....	103
Figura 5.8 Média do teor de lipídios em cada tempo do bioensaio.	104

Figura 5.9 Variação das somas dos HPAs durante o bioensaio de depuração.	105
Figura 5.10 Variação de HPAs totais com tempo de depuração.	105
Figura 5.11 Variação das concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos dibenzotiofenos nas replicatas de esponja conforme o tempo de depuração. A – DBT; B – C1DBT; C – C2DBT; D – C3DBT.	106
Figura 5.12 Correlação do somatório dos dibenzotiofenos com o tempo de depuração.	107
Figura 5.13 Distribuição dos HPAs leves e pesados, considerando apenas os 16 HPAs.	108
Figura 5.14 Distribuição dos HPAs leves e pesados, considerando os HPAs totais.	108
Figura 5.15 Variação dos HPAs totais ao longo do 1º ensaio de depuração.	109
Figura 5.16 Variação dos HPAs totais ao longo do 2º ensaio de depuração.	109
Figura 5.17 Variação dos HPAs totais em amostras agrupadas.	110
Figura 5.18 Tipologia da variação das replicatas nos tempos T0 (A) e T336 (B).	111
Figura 5.19 Tipologia dos HPAs em amostras de campo de água e filtro.	112
Figura 5.20 Teor de lipídios do mesmo indivíduo durante exposição ao criseno.	113
Figura 5.21 Teor de lipídios do mesmo indivíduo durante exposição ao criseno.	114
Figura 5.22 Correlação entre o teor de lipídios e a concentração do criseno.	114
Figura 5.23 Variação da exposição ao criseno no mesmo indivíduo de esponja.	115
Figura 5.24 Variação da exposição ao criseno em diferentes indivíduos de esponja.	115
Figura 5.25 Correlação entre concentração de criseno no mesmo indivíduo e tempo de exposição.	116
Figura 5.26 Correlação entre concentração de criseno em diferentes indivíduos e tempo de exposição.	117

Figura 5.27 Variação do criseno durante os bioensaios de depuração e acumulação até T96.....	117
Figura 5.28 Variação do tempo de retenção do vermelho neutro em indivíduos diferentes (A) e no mesmo indivíduo (B), conforme tempo de exposição.	118
Figura 5.29 Vermelho neutro no interior das células da esponja exposta ao criseno em T96 de indivíduo diferente.	119
Figura 5.30 Tempos de retenção do vermelho neutro conforme concentração de criseno ao longo do ensaio de acumulação (mesmo indivíduo).....	119
Figura 5.31 Tempos de retenção do vermelho neutro conforme concentração de criseno ao longo do ensaio de acumulação.	120
Figura 5.32 Correlação entre o tempo de retenção do vermelho neutro no mesmo indivíduo e a concentração de criseno.	120
Figura 5.33 Correlação entre o tempo de retenção do vermelho neutro em indivíduos diferentes e a concentração de criseno.....	121
Figura 5.34 Média da expressão da glutathione em esponja durante depuração.	122
Figura 5.35 Variação de glutathione em diferentes indivíduos de esponja durante exposição ao criseno.	123
Figura 5.36 Correlação entre a glutathione e tempo de exposição (A) e concentração do criseno (B) em diferentes indivíduos de esponja.	123
Figura 5.37 Variação de glutathione no mesmo indivíduo de esponja.	124
Figura 5.38 Correlação da inibição da glutathione com o tempo (A) e com a acumulação do criseno (B) no mesmo indivíduo de esponja.....	124
Figura 5.39 Redução das cavidades durante ensaio de depuração.....	125
Figura 5.40 Cortes histológicos para a contagem das cavidades durante ensaio de depuração das esponjas.....	126
Figura 5.41 Quantidade de cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) durante exposição ao criseno e diferentes tipologias em T96.	127
Figura 5.42 Média ponderada da quantidade de cavidades em T0 e T96.	127
Figura 5.43 Cortes histológicos para a contagem das cavidades em T0 (A) e T96 (B) do ensaio de acumulação.....	128

Figura 5.44 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração.	129
Figura 5.45 Demonstração da estrutura do tecido da esponja (A) e dos pontos vermelhos representados pelo colágeno (B).	130
Figura 5.46 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração mudanças na estrutura tecidual da esponja.	130
Figura 5.47 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de acumulação.	131
Figura 5.48 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração mudanças na estrutura tecidual da esponja.	131
Figura 5.49 Distribuição dos HPAs em água entre os meses de coleta.	133
Figura 5.50 Distribuição dos HPAs em tecido de esponja entre os meses de coleta para os biomonitoramentos passivo e ativo.	134
Figura 5.51 Distribuição dos HPAs em tecido de esponja entre os meses de coleta para os biomonitoramentos passivo e ativo.	134
Figura 5.52 Tipologia dos HPAs em esponjas em T0, coletadas em Itaipu (A) e Urca (B), para os bioensaios de acumulação e depuração, respectivamente.	135
Figura 5.53 Fator de acumulação em esponja do biomonitoramento passivo.	137
Figura 5.54 Fator de acumulação em esponja do biomonitoramento ativo (T0-Urca).	138
Figura 5.55 Fator de acumulação em tecido de esponja durante exposição ao criseno.	139
Figura 5.56 Razão FA/logK _{OW} para HPAs prioritários em amostras do biomonitoramento passivo.	140
Figura 5.57 Razão FA/logK _{OW} para HPAs prioritários em esponjas (T0) do bioensaio de depuração.	140
Figura 5.58 Log-log plot da soma dos HPAs de alto e baixo peso molecular. AU – água Urca; FU – filtro Urca; AI – água Itaipu; FI – Filtro Itaipu; EI – esponja Itaipu; EU – esponja Urca; EI – esponja Itaipu; EInd – esponja Itaipu mesmo indivíduo.	142
Figura 5.59 Cross-plots das razões diagnósticas aplicadas nas amostras dos biomonitoramentos. E- esponja (I – Itaipu, PXV – Praça XV, U – Urca, Ind – mesmo indivíduo); A - água (I – Itaipu, PXV – Praça XV, U – Urca); F – filtro (I – Itaipu, U – Urca).	143

Lista de tabelas

Tabela 2.1 Potenciais de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs (IARC, 1986).....	28
Tabela 2.2 Características das diferentes fontes de hidrocarbonetos.....	29
Tabela 2.3 Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários da USEPA (adaptado de Pedrete, 2010).	32
Tabela 2.4 Variação da concentração de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em tecidos de organismos marinhos, em ambientes naturais (Neff, 2002).	42
Tabela 4.1 Condições instrumentais do sistema cromatográfico GPC.....	72
Tabela 4.2 Condições instrumentais do sistema cromatográfico CG EM.....	74
Tabela 5.1 Concentrações de HPAs em água em outros estudos.	93
Tabela 5.2 Teor de lipídios das amostras de tecido de <i>Hymeniacidon heliophila</i>	96
Tabela 5.3 Concentrações de HPAs em tecido de <i>Hymeniacidon heliophila</i> e outras espécies de esponjas em diversos estudos.	96
Tabela 5.4 Teor de lipídios em esponjas do bioensaio de depuração....	103
Tabela 5.5 Média do fator de acumulação em tecido da esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i> dos biomonitoramento passivo e ativo.....	136

*“Eu estive aqui
Eu vivi, eu amei
Eu estive aqui
Eu o fiz, eu fiz
Tudo o que eu sempre quis
E foi mais do que eu
esperava que fosse
Deixarei minha marca para
que todos saibam que
Eu estive aqui”*

Letra extraída da música “I was here”
Beyoncé

1

Introdução

A população brasileira está localizada principalmente nas áreas costeiras, sendo as baías e os estuários preferencialmente escolhidos, servindo como fonte alimentar, transporte marítimo e instalações de atividades industriais, aumentando a quantidade de resíduos nos cursos d'água. Considerando este aspecto de ocupação, o ambiente aquático torna-se o receptor final de diversos elementos de origem antrópica, proveniente de rios, com despejo de efluentes no mar, dejetos de navios ou de deposição atmosférica (Kennish, 1997; Akaishi, 2003).

O estudo dos aportes antrópicos no ambiente marinho tem se intensificado ao longo dos anos pela necessidade de se conhecer o impacto, a fim de promover a recuperação de áreas costeiras. Uma infinidade de compostos gerados por atividades antropogênicas, lançados nestas áreas, muitas vezes acabam atingindo concentrações que alteram química, física ou biologicamente o ambiente, tornando-se assim poluentes (Fillmann, 2001). Além disso, é necessário o biomonitoramento destas áreas, utilizando organismos como biomonitores, com o intuito de avaliar o efeito dos poluentes na biota.

Um grupo de compostos químicos que vem sendo monitorado em função do potencial mutagênico e carcinogênico (Bouloubassi & Saliot, 1993; Kim *et al.*, 1999; Lima, 2001; Pedrete, 2010; Sundt *et al.*, 2012) é constituído pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Estes compostos constituem uma das classes de poluentes mais frequentemente encontradas nos sistemas aquáticos, apresentando alta resistência à biodegradação microbiológica e grande estabilidade no ambiente. Salienta-se a importância do monitoramento dos HPAs em ambientes aquáticos, a fim de avaliar a extensão da contaminação ambiental e de seus impactos nos organismos aquáticos.

A hidrofobicidade dos HPAs resulta na acumulação nos tecidos após a exposição e assimilação pelos organismos marinhos, como ocorre nas esponjas Glyzina *et al.*, 2002; Denton *et al.*, 2006; Mahaut *et al.*, 2012). A ausência de informações científicas sobre a dinâmica dos HPAs em esponjas e de seus efeitos

toxicológicos nestes organismos marinhos contribuiu para a escolha do tema estudado. Além disto, foi escolhido um ambiente estuarino tropical, a Baía de Guanabara, já que os poucos estudos de bioacumulação de HPAs em esponjas foram realizados em regiões temperadas (Glyzina *et al.*, 2002; Peachey & Crosby, 1996; Zahn *et al.*, 1981; 1983) e apenas um único no Atlântico Sul (Fontes, 2011). As esponjas já se mostraram como biomonitores de HPAs presentes na coluna d'água e como bioindicadoras de poluição (Fontes, 2011; Mahaut *et al.*, 2012), mas é preciso compreender seus processos de incorporação e eliminação e as propriedades que os regulam, e os efeitos que causam.

1.1. Objetivos

Avaliar a cinética de incorporação e eliminação dos HPAs e seus efeitos nas células da esponja *Hymeniacidon heliophila*, compreendendo as variáveis que as condicionam.

1.1.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a espécie *Hymeniacidon heliophila*, como biomonitora de contaminação por HPAs;
- Analisar níveis de HPAs em tecido de esponjas, água e filtro da Baía de Guanabara por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas;
- Realizar bioensaios para avaliar a taxa de perda de HPAs por volatilização, assim como a incorporação e eliminação da esponja *H. heliophila*;
- Aplicação de biomarcadores citológicos, como o teste do micronúcleo e vermelho neutro, a histologia em células extraídas do tecido da espécie testada, além do biomarcador de estresse oxidativo, a glutatona, e correlacioná-los com a concentração de HPAs nos tecidos;
- Comparar as amostras de campo do biomonitoramento passivo e ativo, avaliando as possíveis fontes de contaminação e analisar a que condições as esponjas (amostras de campo) estavam expostas no ambiente antes da realização dos bioensaios.

2 Revisão Bibliográfica

2.1. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que integra os conceitos de ecologia, em relação à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (Costa *et al.*, 2008). A ecotoxicologia compreende a sequência de eventos apresentada na Figura 2.1, denominada cadeia da causalidade. Esta cadeia permite a determinação dos níveis de contaminantes no ambiente e seus destinos, a estimativa do grau de periculosidade dos contaminantes e seus metabólitos para os organismos e a indicação dos níveis máximos permitidos de contaminantes (de Kruijf, 1988). Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização (Figura 2.2), desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (Ronco *et al.*, 2004).

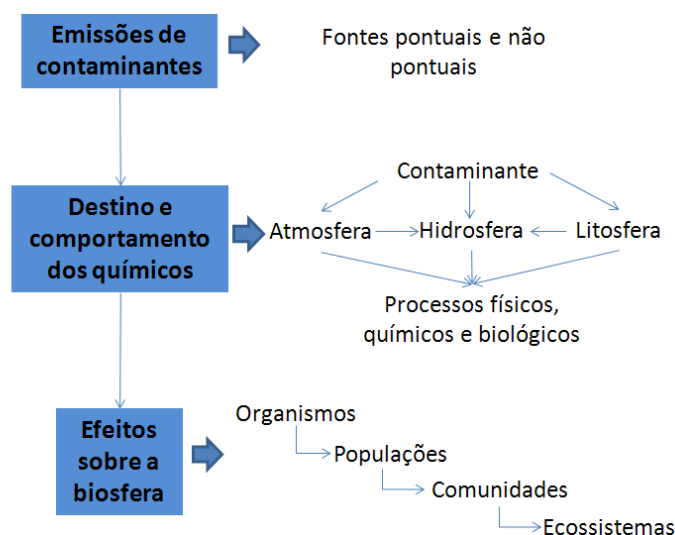


Figura 2.1 Cadeia da causalidade indicando a sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia (adaptado de Costa *et al.*, 2008).

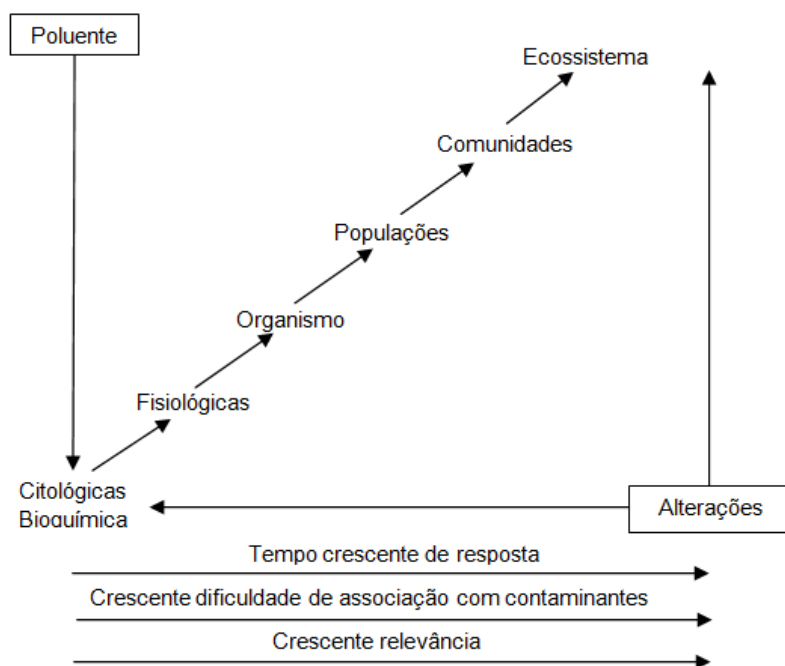


Figura 2.2 Níveis de organização nos quais podem se manifestar os efeitos de agentes tóxicos e tempo de duração da resposta (Zagatto & Bertoletti, 2011).

Os efeitos dos poluentes não podem ser estimados apenas com identificação e a quantificação dos mesmos. A atividade de uma substância pode depender das interações entre compostos, incluindo aqueles que não são tóxicos, mas que afetam as propriedades físico-químicas do sistema e as condições de vida dos organismos. Logo, é impossível identificar uma única substância no ambiente como responsável por um determinado efeito tóxico (Ronco *et al.*, 2004).

Estudos qualitativos e quantitativos dos efeitos adversos de poluentes são realizados em organismos aquáticos. Para isso, é necessário ter conhecimento das fontes de emissão dos poluentes, das transformações e destinos no ambiente, dos riscos potenciais à biota, para a avaliação ecotoxicológica. Tanto as propriedades dos agentes químicos (persistência, concentração), como os processos metabólicos dos organismos (absorção, excreção), determinam o efeito específico num determinado alvo. Além disso, a toxicidade do poluente químico é influenciada por fatores dos organismos (estágio de desenvolvimento), ambientais (pH, oxigênio dissolvido, material particulado), da rota e do tempo de exposição, e do poluente (Lombardi & Fernandez, 2008; Zagatto & Bertoletti, 2011).

De acordo com Akaishi (2003), para avaliar a ação tóxica dos contaminantes pode-se realizar experimentos laboratoriais que utilizam bioensaios

ou estudos no campo. Testes de toxicidade são ensaios realizados sob condições experimentais específicas e controladas, minimizando a influência das variáveis ambientais, e são utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Porém, os resultados obtidos em bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas colaboram para entender os fatores que interferem na saúde dos organismos e/ou alteram as condições do ambiente em que vivem (Dornfeld, 2002).

A importância ambiental do estudo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) deve-se aos efeitos toxicológicos, mutagênicos e carcinogênicos de alguns deste que produzem efeitos sobre a biota (IARC, 1983). A partir das características toxicológicas destes compostos, criaram-se limites de toxicidade para diversos HPAs, que vêm sendo utilizados na avaliação dos possíveis danos à biota (Kim *et al.*, 1999; Tam *et al.*, 2001).

2.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos amplamente distribuídos no meio ambiente, além de muito estáveis e persistentes. São considerados altamente lipofílicos e potencialmente tóxicos para a biota (Aas *et al.*, 2001). Dentre os HPAs, apenas 16 (Figura 2.3) são considerados prioritários em função das propriedades físico-químicas e toxicológicas, segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (U.S. *Environmental Protection Agency* - USEPA).

Os HPAs são formados por carbono e hidrogênio, arrançados com dois ou mais anéis benzênicos lineares, angulares ou mesmo agrupados (Kennish, 1997). Os átomos de carbono podem estar ou não substituídos por radicais alquilas (metil, etil, dimetil, etc.) e o anel pode conter heteroátomos. Informações sobre o nível de degradação destes compostos, as prováveis fontes e destino no meio ambiente podem ser obtidas a partir de suas estruturas moleculares. Nas últimas décadas, tem se dado grande importância a este contaminante, principalmente pelo potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico (Tabela 2.1), que pode variar com a composição química, a matriz associada e a biodisponibilidade aos organismos (Aas *et al.*, 2001; Kennish, 1997).

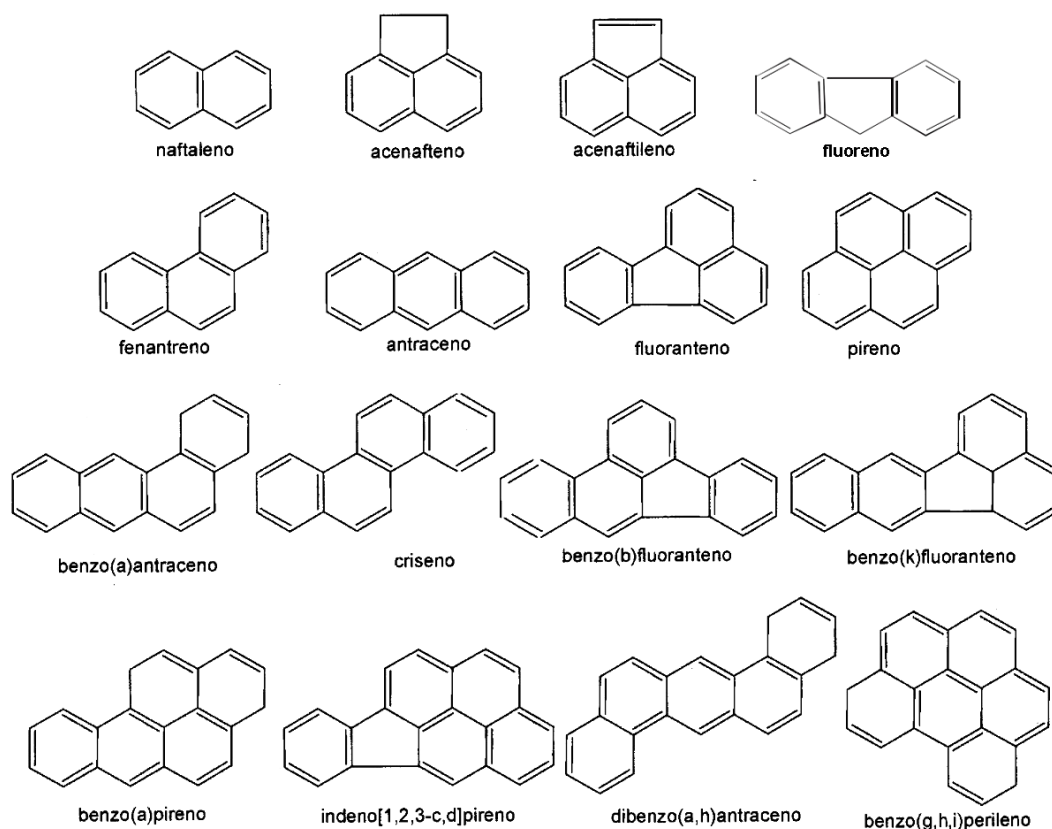


Figura 2.3 Estruturas moleculares dos 16 HPAs prioritários da USEPA.

Tabela 0.1 Potenciais de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs (IARC, 1986).

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade	Mutagenicidade
Fenantreno	I	L	+
Fluoranteno	N	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzo(a)antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Benzo(a)pireno	S	S	+
Indeno(1,2,3-cd)pireno	S	I	+
Dibenzo(a,h)antraceno	S	S	+
Benzo(g,h,i)perileno	I	I	+

S → suficientes; I → insuficientes; L → limitados; N → não-carcinogênico

Genotoxicidade avaliada através dos testes de deterioração do DNA

Mutagenicidade (teste de Ames): + → positivo - → negativo

2.2.1.

Origem e fontes

A maior fonte de hidrocarbonetos é antrópica. As fontes naturais representam menos que 20 % de todas as fontes, como apresentado na Figura 2.4. Em geral, a contaminação ambiental é composta por uma mistura complexa de HPAs, e não por compostos isolados (Walker, 2007).

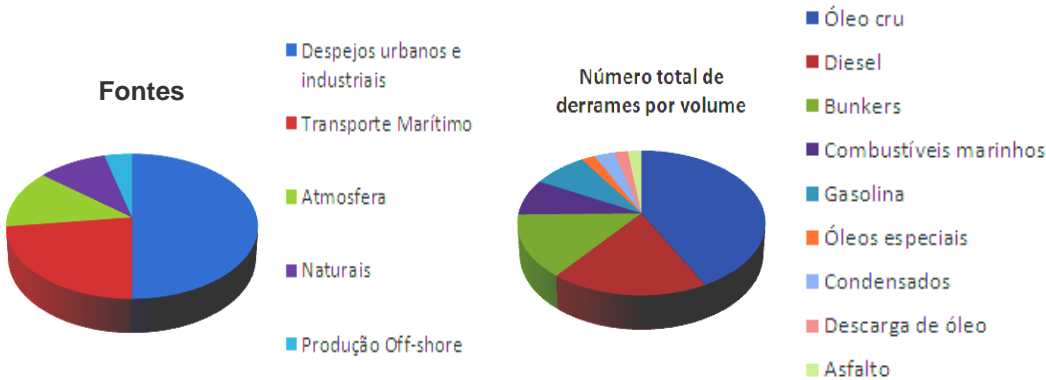


Figura 2.4 Fontes de hidrocarbonetos naturais e antropogênicas (Fingas, 2001).

Os HPAs podem ser produzidos, basicamente, de três modos: pirólise de matéria orgânica em altas temperaturas, diagênese de material orgânico sedimentar em temperaturas baixas ou moderadas, para formar combustíveis fósseis e biossíntese direta por microorganismos ou plantas (Neff, 1979). A origem destes compostos depende da maneira como foram formados (Tabela 2.2).

Tabela 0.2 Características das diferentes fontes de hidrocarbonetos.

Origem		Características de formação
Natural	Petrogênica	Exsudação do assoalho oceânico
	Pirolítica	Queimadas naturais
	Biogênica	Biossíntese direta dos organismos
Antrópica	Petrogênica	Combustíveis fósseis, formados pelo rearranjo e transformação da matéria orgânica biogênica em temperaturas baixas (100-300 °C)
	Pirolítica	Queima incompleta da matéria orgânica em altas temperaturas (700 °C)

2.2.1.1. Naturais

A maioria dos HPAs lançados no meio marinho que provém de fontes naturais pode ser sintetizada por bactérias, plantas, fungos ou mesmo ser liberada através de produtos e processos naturais como erupções vulcânicas, queimadas naturais, síntese biológica, formação de combustíveis fósseis ou de extrusão natural do solo oceânico (Kim *et al.*, 1999; McElroy *et al.*, 1989).

Grande parte dos hidrocarbonetos de origem biogênica pode ser facilmente degradada por bactérias e outros microorganismos, não sendo detectado o seu impacto no ambiente em longo prazo (Neff, 1979). Segundo Kennish (1997), a biossíntese pelos organismos equivale a 2700 ton ano⁻¹.

2.2.1.2. Antrópicas

As zonas costeiras estão diretamente submetidas a impactos antrópicos. Grandes quantidades de HPAs lançadas ao meio marinho são oriundas de fontes antropogênicas (Kennish, 1997). Dentre estas fontes, as principais são os efluentes industriais e domésticos, derrames de óleo e deposição atmosférica (Clark, 1997).

O petróleo é um dos contaminantes mais dispersos em todo o mundo e seus componentes podem produzir efeitos em diferentes níveis de organização biológica. O aporte petrogênico nos sistemas aquáticos é decorrente dos vazamentos na exploração *offshore*, da água produzida do petróleo, lançamentos industriais, de resíduos de exploração e refino (Neff, 1979; Clark, 1992).

Os HPAs são os compostos mais abundantes no petróleo e geralmente contêm mais componentes alquilados do que não substituídos. Segundo Gesamp (1993), as condições durante a formação do petróleo tendem a gerar hidrocarbonetos aromáticos alquilados em maiores concentrações que os parentais, enquanto processos de combustão a temperaturas relativamente altas favorecem a formação de HPAs não alquilados (Figura 2.5). Isto ocorre porque em condições de alta temperatura e aquecimento mais rápido, como em processos de combustão, os compostos alquilados sofrem craqueamento térmico, resultando em maior abundância de compostos não alquilados (Bouloubassi & Saliot, 1993).

Homólogos com dois a cinco alquilas são, normalmente, mais abundantes do que os compostos com apenas uma metila ou com mais de cinco metilas (Neff, 2002).

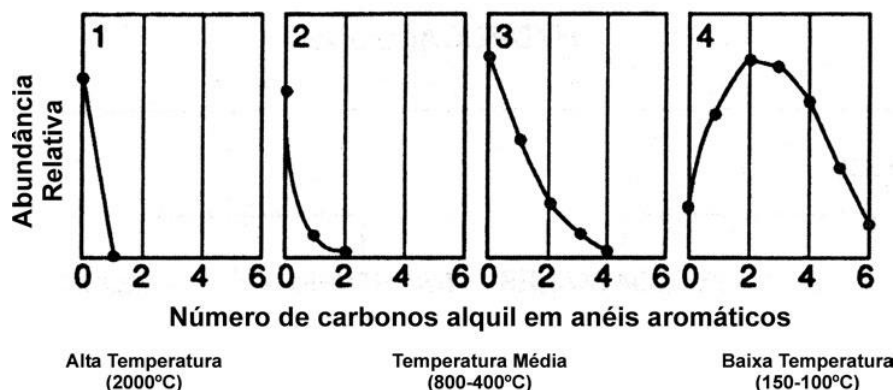


Figura 2.5 Abundância relativa de compostos parentais e alquil-substituídos como influência da temperatura de formação (modificado de NRC, 1985, *apud* Massone, 2004).

A diferenciação entre os dois tipos de aporte é possível a partir da distribuição dos componentes homólogos que compõem a mistura de HPAs. Os HPAs pirogênicos, geralmente, são caracterizados pela dominância de compostos não substituídos sobre seus correspondentes homólogos alquilados e pela dominância de HPAs de alta massa molecular (no inglês *High Molecular Weight* - HMW), com 4 a 6 anéis em relação aos de baixa massa molecular (no inglês *Low Molecular Weight* - LMW), contendo de 2 a 3 anéis (Yunker *et al.*, 2002). Enquanto os de origem petrogênica exibem um perfil de distribuição característico no formato de sino, e podem ter sua distribuição modificada por $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$, devido ao intemperismo ou degradação (Wang *et al.*, 1999). Além disso, a caracterização dos HPAs pode ser acessada através do uso de índices baseados nas razões das concentrações de HPAs.

2.2.2. Propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas (Tabela 2.3) dos HPAs estão relacionadas com a massa molecular. Existem duas classes distintas quanto às propriedades físicas e químicas: compostos de baixa massa molecular, com 2-3 anéis e de alta massa molecular, com 4-7 anéis (Neff, 1979).

Tabela 0.3 Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários da USEPA (adaptado de Pedrete, 2010).

	HPA	Fórmula molecular	Nº de anéis	MM ^A (g mol ⁻¹)	PF ^B (°C)	PE ^C (°C)	Solubilidade em água ^D (mg L ⁻¹) a 25° C	Log K _{ow} ^E	Log K _{oc} ^F	Log K _d ^G	Pressão de vapor ^H (Pa a 25° C)	Constante Henry ^I Atm.m ³ /mol 10 ⁻⁶ ar/água
1	Naftaleno	C ₁₀ H ₈	2	128	80	218	31,8	3,4	3,0	1,7	10,5	483
2	Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	3	152	92	265	16,1	4,1	-	-	-	-
3	Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	3	154	96	279	3,7	3,9	3,7	-	0,36	145
4	Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	3	166	116	293	1,98	4,2	3,9	-	9 X 10 ⁻²	91
5	Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	3	178	101	340	1,2	4,6	4,2	2,7	1,8 x 10 ⁻²	39,3
6	Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	3	178	216	340	1,29	4,57	4,4	2,7	7,5 x 10 ⁻⁴	49,7
7	Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	4	202	111	-	0,26	5,2	4,9	3,7	1,2 x 10 ⁻³	11,6
8	Pireno	C ₁₆ H ₁₀	4	202	149	360	0,15	5,2	-	3,7	8,86 x 10 ⁻⁴	5
9	Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂	4	228	158	400	1,1 x 10 ⁻²	5,84	-	4,2	7,3 x 10 ⁻⁶	-
10	Criseno	C ₁₈ H ₁₂	4	228	255	-	3 x 10 ⁻³	5,84	-	4,2	5,7 x 10 ⁻⁷	-
11	Benzo(b)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5	252	167	-	1,5 x 10 ⁻³	6,6	5,2	5,0	-	12
12	Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5	252	217	480	7,6 x 10 ⁻⁴	6,8	5,9	4,9	6,0 x 10 ⁻⁷	0,7
13	Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	5	252	179	496	3,8 x 10 ⁻³	6,4	6,0	4,9	7,3 x 10 ⁻⁷	0,4
14	Indeno(1,2,3-cd)pireno	-	6	276	163	-	1,9 x 10 ⁻⁴	6,6	6,8	5,6	-	0,3
15	Dibenzo(a,h)antraceno	C ₂₂ H ₁₄	5	278	262	-	5,1 x 10 ⁻⁴	6,7	6,1	5,6	3,7 x 10 ⁻¹⁰	0,05
16	Benzo(g,h,i)perileno	-	6	276	222	-	5,5 x 10 ⁻³	7,04	-	5,6	6,0 x 10 ⁻⁸	-

^AMM → Massa Molar ^BPF → Ponto de fusão ^CPE → Ponto de Ebulição^DSolubilidade de uma substância em água → concentração mássica desta substância em água^EK_{ow} → coeficiente de partição *n*-octanol/água → razão entre as concentrações de equilíbrio da substância nas 2 fases constituídas de solventes que não se misturam;^FK_{oc} → coeficiente de partição carbono orgânico/água → razão entre a quantidade adsorvida de um composto por unidade de massa de carbono orgânico do solo ou sedimento e a concentração deste mesmo composto em solução aquosa em equilíbrio^GK_d → coeficiente de partição sedimento/água → razão entre a concentração de um elemento adsorvido no sedimento e a concentração deste em solução aquosa em equilíbrio^HPressão de vapor → pressão de saturação de uma substância líquida ou sólida^IConstante de Henry → traduz a propriedade de uma substância em se distribuir entre 2 fases de um sistema binário ar/água (25° C)

Compostos de baixa massa molecular são mais voláteis, menos lipofílicos e, portanto mais solúveis em água do que aqueles de maior massa molecular. A pressão de vapor e a de solubilidade tendem a decrescer com o aumento da massa molecular. As consequências destas diferenças são a distribuição no ambiente e os efeitos nos sistemas biológicos.

Dentre as diversas propriedades que caracterizam o comportamento dos HPAs no meio ambiente, destacam-se a solubilidades em água (C^S) e o coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}).

A solubilidade pode direcionar a partição água-particulado, sendo que os HPAs menos solúveis adsorvem-se ao material particulado presente na coluna d'água e, eventualmente, são removidos desta por sedimentação (Gschwend & Schwarzenbach, 1992). O grau de exposição dos organismos aquáticos aos compostos e a toxicidade destes são influenciados por esta propriedade. A baixa solubilidade e complexidade da estrutura química dos HPAs com peso molecular elevado confere resistência à degradação bacteriana (Cerniglia & Heitkamp, 1989). Segundo Neff (1979), os HPAs alquilados apresentam geralmente solubilidades menores que seus homólogos não-substituídos, sendo que a solubilidade diminui com o grau de alquilação. A solubilidade também é alterada conforme disposição dos anéis. Os HPAs lineares tendem a ser menos solúveis do que seus isômeros condensados.

O coeficiente de partição *n*-octanol-água (K_{OW}) é o índice que simula a partição dos compostos entre água e os lipídios bióticos e favorece a transferência de HPAs da fase aquosa para compartimentos lipofílicos em organismos, onde estes compostos podem ser acumulados (Neff, 2002; Baird & Cann, 2011).

As relações entre a toxicidade e a hidrofobicidade (como indicado pelo $\log K_{OW}$) baseiam-se no pressuposto que os HPAs são tóxicos não seletivos, pelo menos sob condições de exposição aguda. A sua toxicidade depende da obtenção de um volume crítico ou da concentração nos tecidos de organismos marinhos. A concentração crítica de um HPA em tecidos de organismos marinhos é atingida (de ocorrência de efeitos tóxicos) quando a atividade do hidrocarboneto em solução (proporcional à razão entre a concentração em solução e a concentração de saturação)

na água atinge certo valor, dependente do particionamento de equilíbrio (Warne et al., 1991).

2.2.3.

Dinâmica e distribuição dos HPAs nos ambientes aquáticos

O ambiente marinho recebe quantidades de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos liberadas de diversas fontes, que se distribuem por toda a coluna d'água e sedimentos. Os contaminantes podem estar dissolvidos na coluna d'água, adsorvidos (depositados) no fundo, absorvidos em componentes bióticos e abióticos e/ou acumulados (incorporados). Os HPAs podem sofrer alterações estruturais que modificam sua interação, distribuição e tempo de permanência no ambiente, além do seu potencial tóxico (Figura 2.6). Os processos que regulam estas alterações são determinados por propriedades físico-químicas dos HPAs (Jaffé, 1991). Tais processos determinam o destino e os impactos destes sobre ambientes naturais.

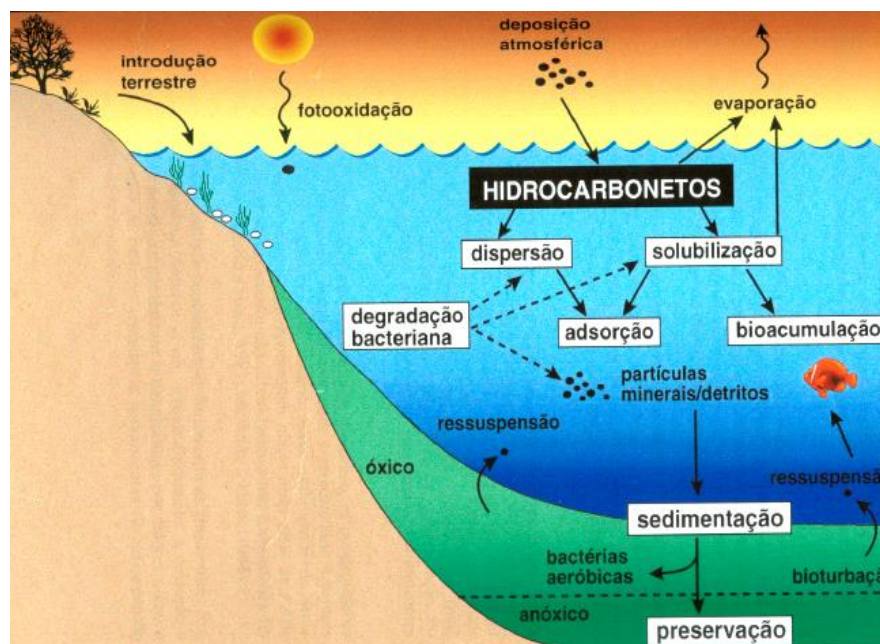


Figura 2.6 Alterações dos HPAs no meio ambiente (Lima, 1996).

Os HPAs podem estar presentes nos compartimentos de água, sedimento e atmosfera. Na água, podem estar dissolvidos, associados à matéria orgânica

dissolvida, ou adsorvidos às partículas ou colóides em suspensão. No sedimento, podem ser encontrados adsorvidos sobre as partículas ou dissolvidos na água intersticial. Na atmosfera, estes agentes químicos podem estar sob a forma gasosa ou adsorvida sobre o material particulado atmosférico, sendo que os HPAs de baixo peso molecular, com maiores pressões de vapor, são transferidos mais rapidamente para atmosfera, e os menos voláteis são adsorvidos ao material particulado e depositados no sedimento. A lixiviação ou atividade biológica no sedimento pode remobilizar uma pequena fração deste contendo HPAs para a coluna d'água, podendo, então, serem rapidamente acumulados pela biota aquática em níveis muito maiores do que aqueles do ambiente (bioconcentração) (Neff, 1979).

Fatores relacionados à dinâmica local, como correntes ou remoção por dragagem, contribuem para a disponibilização deste tipo de poluente. Estes processos de remoção podem transferir hidrocarbonetos associados ao sedimento de volta à coluna d'água e, conseqüentemente, torná-los biodisponíveis para um grande número de espécies aquáticas. Processos de bioturbação também transferem significativamente HPAs para coluna d'água. Esta transferência ocorre principalmente em locais de baixa dinâmica ou onde alterações físicas tem uma ação reduzida (McElroy *et al.*, 1989).

Os HPAs podem estar disponíveis aos organismos ao longo do ciclo biogeoquímico destes compostos. A disponibilidade dos HPAs dissolvidos na coluna d'água é maior que a dos adsorvidos em sedimentos e partículas. A absorção destes xenobióticos por organismos aquáticos pode ocorrer através da via alimentar ou através da absorção ou filtração (Neff, 1979).

2.2.3.1.

Foto-oxidação e (bio)degradação dos HPAs

Em ecossistemas aquáticos os HPAs podem ser degradados por foto-oxidação química na camada de água superficial da coluna d'água (zona eufótica) e pela atividade microbiológica no sedimento e no material particulado (Figura 2.7).

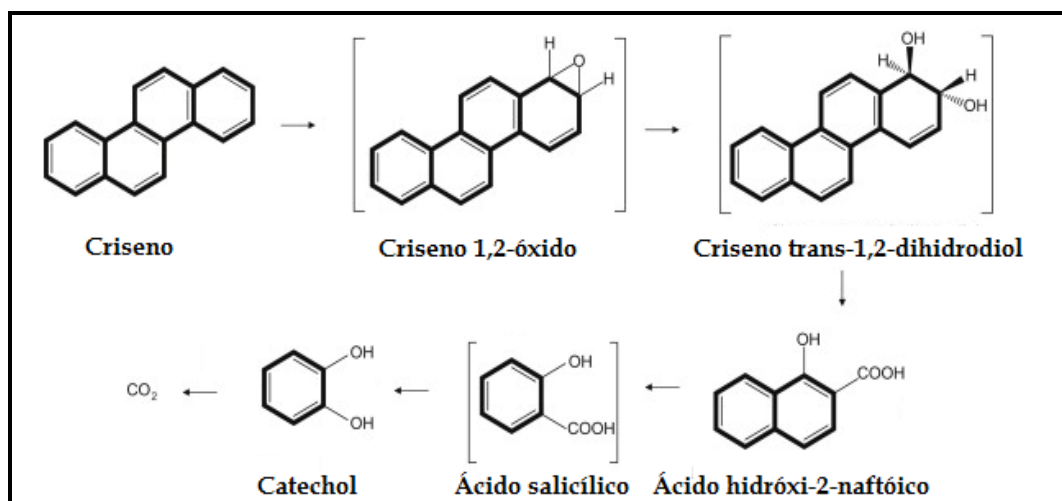


Figura 2.7 Biodegradação do criseno pelo fungo *Fusarium sp.* (modificado de Hidayat *et al.*, 2012).

Em vista da complexidade e da estabilidade da estrutura química dos HPAs, alguns microrganismos não possuem enzimas capazes de degradá-los (Johnsen *et al.*, 2005). Apesar disso, HPAs com 2 e 3 anéis, depositados no sedimento, são rapidamente degradados por bactérias e fungos. HPAs com mais anéis são mais resistentes, e, conseqüentemente, as concentrações destes no sedimento aumentam ao longo do tempo (Cerniglia & Heitkamp, 1989).

A degradação dos HPAs no ambiente também pode ocorrer através de processos químicos e físicos. A interação entre moléculas e íons ou a excitação de átomos por efeito da luz e da temperatura conduzem a desestabilização da estrutura das moléculas e ao rompimento das ligações. No entanto, estes processos são lentos e incompletos, sendo que a biodegradação é a principal via de eliminação dos HPAs no solo (Prince & Drake, 1999). A eficiência desta pode ser reduzida se as condições químicas e físicas não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores.

O processo é variável com o tempo e a natureza da exposição. Além disso, depende do peso e da estrutura molecular dos compostos de cada tipo de óleo, das condições climáticas locais e da dinâmica do ambiente afetado. Outro fator que interfere na taxa de degradação é a susceptibilidade dos compostos aromáticos, a qual está relacionada ao número de anéis de suas estruturas (grau de alquilação), isto é,

quanto menor os números de anéis benzênicos, mais rapidamente são degradados (Cerniglia & Heitkamp, 1989; Hidayat *et al.*, 2012).

2.2.4.

Dinâmica e efeitos dos HPAs em organismos marinhos

A absorção dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos depende da sua biodisponibilidade, assim como da fisiologia dos organismos expostos. Os principais processos envolvidos na absorção de HPAs por organismos são: bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação. A bioconcentração é a incorporação de compostos somente da água, através da respiração e da absorção cutânea, enquanto a bioacumulação é a absorção de contaminantes a partir de várias rotas de exposição, como alimentação, água e sedimento. Diversos fatores influenciam a absorção dos compostos, como a solubilidade e a estabilidade dos contaminantes, a dureza e a salinidade da água, e o teor de lipídios e a taxa metabólica dos organismos. A biomagnificação é o aumento da concentração dos resíduos químicos nos organismos, através da alimentação, ao longo da cadeia trófica (Zagatto & Bertoletti, 2011).

Animais marinhos que tenham sido expostos a grandes derramamentos de óleo, acumulam HPAs em concentrações muito maiores do que as normalmente encontradas nos ambientes aquáticos. Estudos realizados com a biota marinha após derrames acidentais, como o *Amoco Cadiz* (1978, França), *Exxon Valdez* (1989, Alaska) e da Guerra do Golfo (1991), mostraram rápida bioacumulação destes compostos, especialmente daqueles de baixo peso molecular (2-3 anéis). Monitoramentos posteriores indicaram a redução dos níveis dos HPAs (Neff, 2002).

Após absorção pelos organismos, os HPAs podem ser acumulados, mesmo a partir de baixas concentrações no ambiente, no alimento ou em sedimentos. Os coeficientes de partição lipídio/água favorecem sua rápida transferência da fase aquosa para compartimentos lipofílicos nos organismos, podendo ser depositados e acumulados em órgãos ricos em lipídios (Neff, 1979). No entanto, os vertebrados possuem um sistema oxidase bem desenvolvido, onde os HPAs são eficientemente biotransformados e excretados. Enquanto os invertebrados possuem baixo potencial metabólico (Walker, 2007).

2.2.4.1. Metabolização dos HPAs

Mecanismos de defesa foram desenvolvidos em diversos grupos de organismos para combater o vasto número de compostos lançados de forma natural ou antropogênica. Dentre estes mecanismos, o sistema enzimático P-450, dependente do sistema oxidase de função mista (*mixed function oxidase* – MFO - *system*), é um dos principais responsáveis pela metabolização, ativação e inativação de químicos exógenos e endógenos, sendo alguns deles tóxicos e outros importantes reguladores moleculares (Stegeman & Livingstone, 1998). O principal método de ação das enzimas do citocromo P-450 é a introdução de um grupo funcional convertendo em estruturas hidrofílicas.

Para isso são descritas duas etapas, a Fase I ou Reações de Funcionalização e Fase II ou Reações de Conjugação (Figura 2.8). Na Fase I um grande número de enzimas catalisa reações químicas no composto, como oxidação, redução, hidrólise, hidratação entre outras. Isto sugere que a principal função desta primeira etapa é a indução de grupos reativos funcionais como -OH, -NH₂, -SH, -COOH, na molécula do xenobiótico, formando os derivados epóxi e hidróxi (derivados hidroxilados). Esta fase prepara a molécula para a conjugação em uma variedade de compostos solúveis em água, como glucuronídeos e sulfatos, que acontece na Fase II do metabolismo. Desta forma, a Fase II do metabolismo representa o principal caminho de destoxificação, que converte os metabólitos da fase I em conjugados (grupos polares), aumentando a solubilidade do xenobiótico (Livingstone, 1991). No entanto, durante o curso de algumas reações, principalmente na Fase I, intermediários formados podem apresentar maior toxicidade, mutagenia e carcinogenia que compostos parentais. Segundo Baird & Cann (2012), os efeitos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são causados principalmente por seus metabólitos (derivados oxidados).

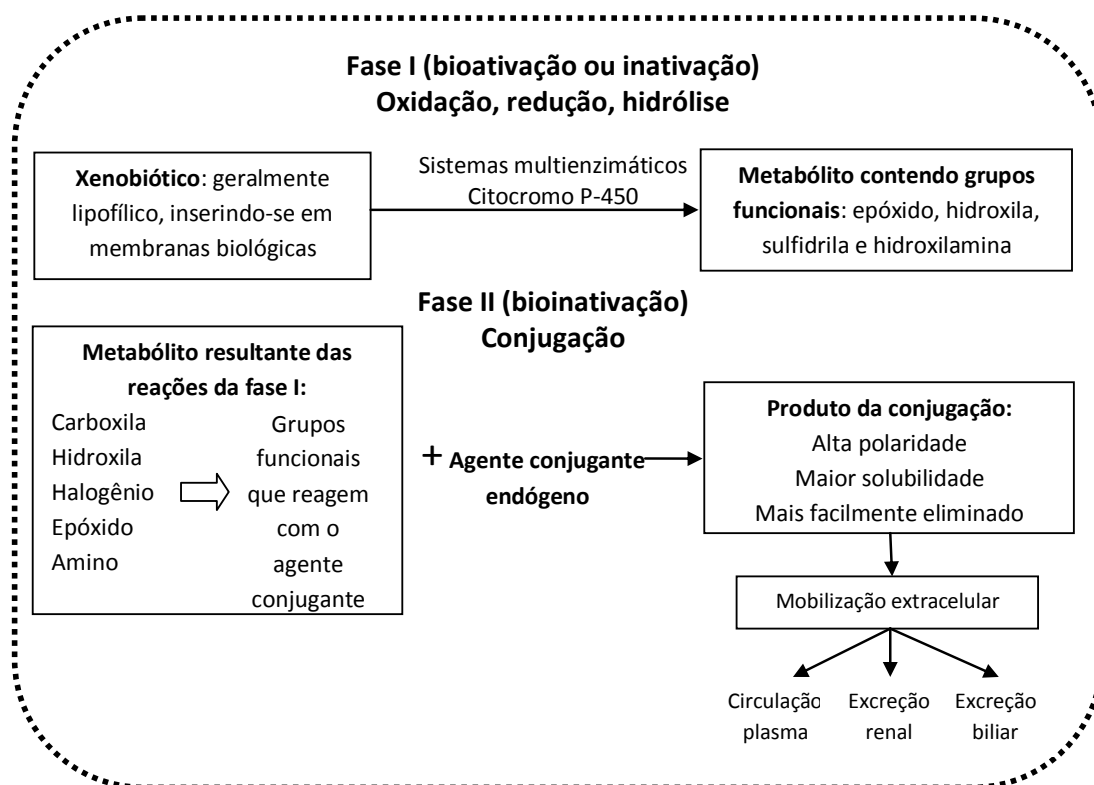


Figura 2.8 Biotransformação de xenobióticos (modificado de Manahan, 1992).

A biotransformação, ou seja, a transformação metabólica de compostos químicos é necessária para que haja a alteração da atividade biológica do composto e para que a interação entre a célula afetada e o agente agressor cesse. O conhecimento das variáveis da biotransformação de contaminantes é fundamental para elaborar os diferentes testes de toxicidade, desenvolver técnicas de biomarcadores, modelar o comportamento de contaminantes no meio ambiente e entender a seletividade na biotransformação (Livingstone, 1991).

Muitos compostos lipofílicos podem se acumular quase que indefinidamente, se o organismo não for capaz de transformá-los em metabólitos hidrofílicos, para fins de excreção. A metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos está presente em diferentes grupos de organismos. No entanto, os invertebrados possuem capacidade metabólica inferior aos vertebrados, acumulando-os em seus compartimentos lipofílicos.

Um grande número de estudos relaciona a exposição de xenobióticos e processos metabólicos. Diversos trabalhos identificaram metabólitos primários e

conjugados de HPAs em bile e urina de vertebrados e invertebrados marinhos (Watson *et al.*, 2004; Sundt *et al.*, 2012; Sette *et al.*, 2013).

O metabolismo do criseno, por exemplo, envolve a introdução de oxigênio pelo sistema de função oxidase mista, produzindo fenóis, dihidrodióis e epóxidos como metabólitos de fase I que sofrem conjugação, resultando em metabólitos de fase II altamente solúveis em água, como glucuronídeos e sulfatos (Varanasi *et al.*, 1989).

2.2.4.2. Efeitos

A exposição aos HPAs pode causar efeitos subletais nos organismos aquáticos, podendo comprometer sua sobrevivência (Lima, 2001). Existem evidências de que os HPAs são capazes de causar distúrbios no fígado, no sistema imunológico, leucemia, câncer e tumores no pulmão e estômago, além de terem potencial para causar danos nas células sanguíneas (Gesamp, 1993; IARC, 1983; 1986).

Os HPAs podem interagir com as células dos organismos de duas maneiras, causando assim, efeitos tóxicos: quando estes se ligam reversivelmente aos sítios lipofílicos nas células e, portanto, podendo interferir numa série de processos celulares, e quando os metabólitos, hidrofílicos e reativos, ligam-se covalentemente a estruturas celulares, causando danos em longo prazo (Neff, 1979).

A toxicidade dos HPAs está relacionada com a capacidade de produzir efeitos deletérios em um organismo (Figura 2.9). A mutagenicidade e a carcinogenicidade dos HPAs estão relacionadas com os compostos eletrofílicos formados na fase I da biotransformação, que podem se ligar com DNA, RNA ou proteínas e induzir mutações genéticas e tumores cancerígenos (Varanasi *et al.*, 1989; Neff, 2002).

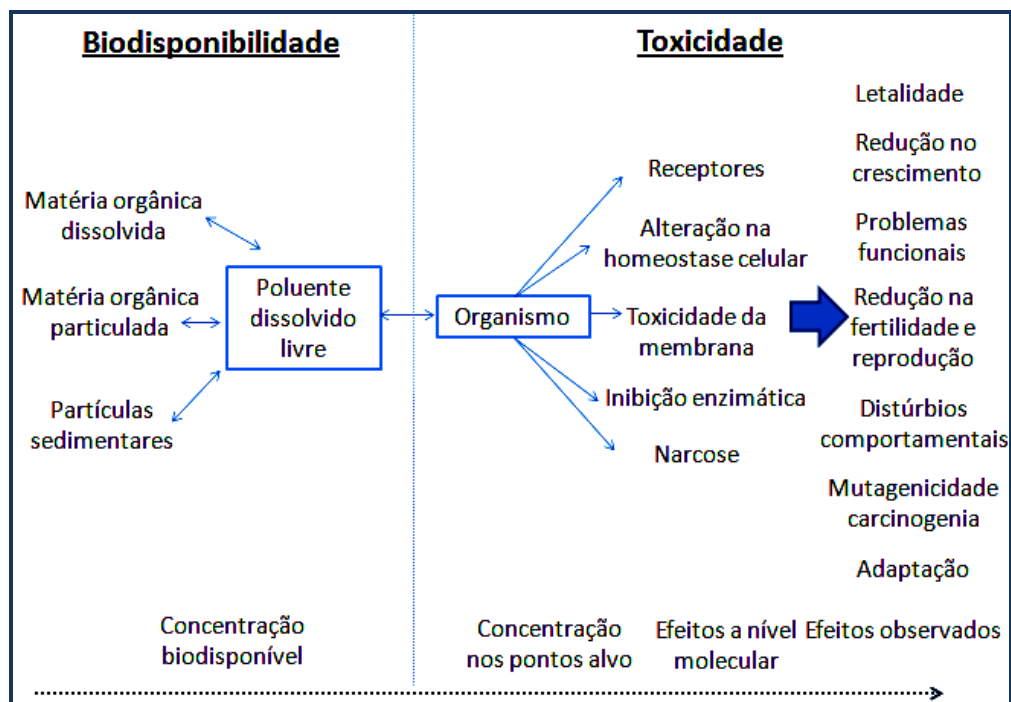


Figura 2.9 Cinética, biodisponibilidade e efeitos gerados pela exposição de contaminantes (adaptado de Fent, 2003).

Os HPAs leves são muitos mais tóxicos, devido à maior disponibilidade, no entanto apresentam baixo potencial carcinogênico para os organismos aquáticos, enquanto os compostos pesados possuem baixa toxicidade aguda com maior potencial carcinogênico (Kennish, 1997; Neff, 1979). Alguns HPAs, como fenantreno, criseno e benzo(a)pireno, possuem uma região côncava, conhecida como região de “baía”, formada pelas ramificações na sequência de anéis benzênicos (Figura 2.10). A organização dos átomos de carbono fornece um alto grau de reatividade bioquímica, conferindo um potencial de carcinogenicidade (Baird & Cann, 2012).

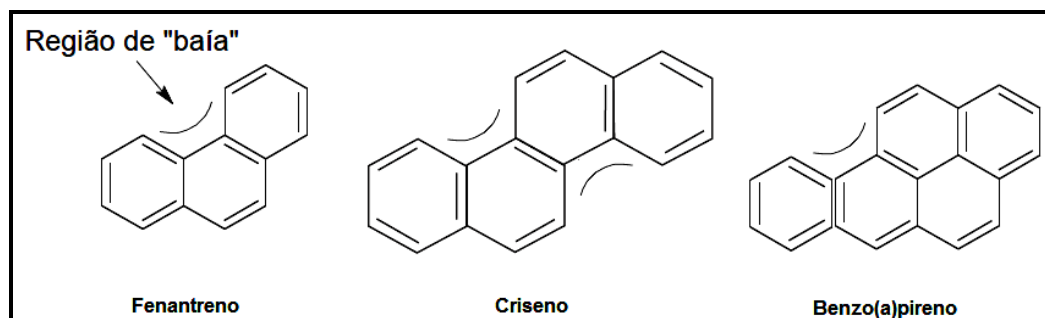


Figura 2.10 Região de “baía” de certos HPAs.

O criseno consiste em 4 anéis benzênicos condensados e é formado através da combustão incompleta de matéria orgânica ou pirólise de carvão e óleo cru, e é um contaminante bastante presente no ambiente, devido, principalmente, às atividades antrópicas (ATSDR, 1990). A solubilidade do criseno relativamente baixa em água do mar ($2 \mu\text{g L}^{-1}$ a 25°C) promove a adsorção deste ao material particulado, seguida de sedimentação (Neff, 1979). No refino de petróleo bruto, este HPA é formado a partir do craqueamento catalítico na fração de alto ponto de ebulição. Despejos de efluentes industriais e produtos refinados do óleo (lubrificantes e óleo diesel) no ambiente marinho contribuem para concentrações relativamente altas de criseno em áreas industrializadas (Hadibarata & Tachibana, 2009).

Em vista da característica fortemente apolar, os HPAs são lipossolúveis e prontamente absorvidos nos organismos marinhos. A acumulação dos HPAs nos tecidos dos organismos aquáticos resulta do equilíbrio entre a aquisição (*uptake*) dos HPAs, que depende da biodisponibilidade do contaminante e da dieta do organismo, e a depuração, que depende da capacidade de biotransformação dos organismos (Maceno, 2010).

A taxa de assimilação necessita exceder a taxa de eliminação para que haja a bioacumulação de um xenobiótico. De acordo com Neff (2002), as concentrações de HPAs individuais e de HPAs totais nos tecidos de animais marinhos são muito variáveis (Tabela 2.4).

Tabela 0.4 Variação da concentração de HPAs totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em tecidos de organismos marinhos, em ambientes naturais (Neff, 2002).

Organismo	Tipo de Tecido	Concentração
Macroalgas	Inteiro	0,26 – 4,66
Poliquetas	Inteiro	0,0073 – 1,12
Crustáceos	Glândula digestiva	1,4 – 440
Molusco Bivalve	Parte mole	0,003 – 1729
Molusco Gastrópode	Parte mole	0,01 – 290
Polvo	Inteiro	0,46 – 0,73
Equinoderma	Inteiro	0,0005 – 0,46
Peixes	Músculo	0,002 – 23,45
Pássaros Marinhos	Músculo	0,021 – 0,11
Mamíferos Marinhos	Músculo	0,014 – 0,51
Mamíferos Marinhos	Fígado	0,55 – 2,8

2.3. Biomonitoramento

O uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente é conhecido como biomonitoramento. Este tipo de estudo é vantajoso por integrar as condições ambientais vividas pela biota durante todo o seu ciclo de vida (Strieder *et al.*, 2006). Entretanto, um dos problemas em utilizar as respostas biológicas para monitorar a poluição é a dificuldade na determinação da influência de fatores naturais intrínsecos e extrínsecos daqueles ocasionados por atividades antropogênicas (Elias *et al.*, 2006).

O biomonitoramento possui duas abordagens diferentes para a quantificação e monitoramento de compostos em tecidos de organismos marinhos: o biomonitoramento passivo que emprega a coleta de animais diretamente de seus habitats onde a população natural já existe, e o ativo envolve a coleta de uma população que foi transferida e mantida em locais a serem monitorados.

A avaliação da exposição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em organismos marinhos é feita através do biomonitoramento destes compostos, de suas vias de penetração no organismo e de seu metabolismo, sendo desejável que esta avaliação dos efeitos biológicos se dê precocemente.

2.3.1. Biomarcadores

Biomarcadores são respostas biológicas produzidas pela presença de certas substâncias químicas no ambiente, envolvendo variações bioquímicas, histológicas, fisiológicas, citoquímicas e comportamentais. Os biomarcadores fornecem dados sobre o efeito dos poluentes, sendo utilizados de maneira integrada com as análises químicas, nos programas de monitoramento. Em relação à avaliação dos riscos ambientais, os biomarcadores permitem a detecção de poluentes e a identificação de populações em risco. Os bioindicadores destas mudanças podem ser materiais biológicos de diversos níveis, que fornecem uma medida de exposição e às vezes do efeito tóxico de um determinado contaminante (Walker, 2007).

Os biomarcadores se dividem em três classes: os biomarcadores de exposição estimam a dose interna ou a biodisponibilidade de um determinado xenobiótico ou o seu metabólito em um organismo; os biomarcadores de efeito detectam estresse manifestado a níveis de organização biológica, não apontando necessariamente o agente responsável e os biomarcadores de susceptibilidade indicam a habilidade adquirida de um organismo a responder a exposição a um xenobiótico (Figura 2.11).

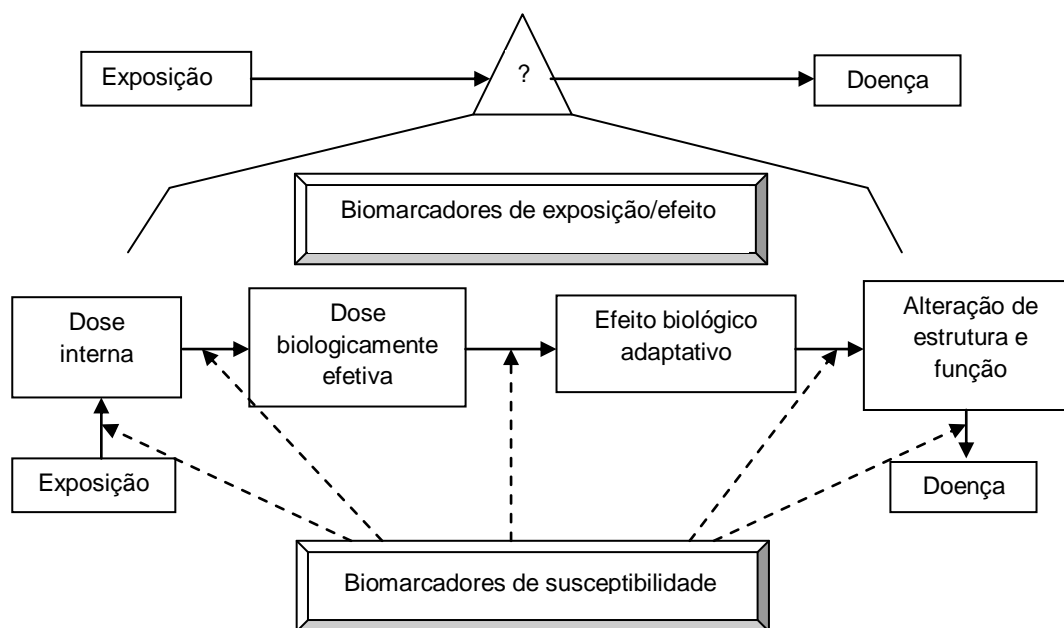


Figura 2.11 Diferenças entre os biomarcadores (Schlenk, 1999).

A disponibilidade e o uso de tais medidas podem reduzir as incertezas na avaliação da exposição, reforçando a avaliação de risco ambiental. De acordo com Lima (2001), biomarcadores específicos e não específicos tem sido empregados em monitoramentos, *in situ* e em laboratório, para avaliar a contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O uso de biomarcadores fornece uma indicação sensível de exposição aos HPAs, pois indica a ocorrência destes compostos no meio ambiente, a disponibilidade dos mesmos para a captação por um organismo e a capacidade deste de biotransformá-los (Baird & Cann, 2012).

2.3.1.1.

Compostos policíclicos aromáticos

Diferentes metodologias têm sido aplicadas na determinação das concentrações dos HPAs a fim de avaliar a contaminação ambiental, principalmente através de compartimentos como água e sedimento (Kim *et al.*, 1999; Massone, 2004; Zhou & Maskoui, 2003). O uso de matrizes biológicas, diferentemente de amostras de água e sedimento, possibilita fornecer uma avaliação integrada de todas as vias de exposição e consequente assimilação. A concentração de HPAs em amostras biológicas está associada a três fatores principais: a variação da concentração destes no ambiente; os diferentes graus de bioassimilação de cada composto e a capacidade de metabolização destes pelos diferentes grupos de organismos (Kennish, 1997). Um vasto número de trabalhos utiliza métodos cromatográficos para determinação dos níveis de HPAs em tecidos biológicos como, tecido de esponjas (Denton *et al.*, 2006; Fontes, 2011), partes moles de moluscos (Lima, 2001; Lima *et al.*, 2001), músculo de peixes e tecidos moles de crustáceos (Fossi *et al.*, 2000; Nudi *et al.*, 2010) e fluidos biológicos (Watson *et al.*, 2004; Sette *et al.*, 2013).

2.3.1.2.

Vermelho neutro

A fim de avaliar o impacto de contaminantes no ecossistema, é preciso considerar alterações em componentes subcelulares altamente estruturais e funcionais, como os lisossomos, que são organelas subcelulares delimitadas por uma membrana semipermeável de lipoproteína contendo hidroxilases ácidas. Os lisossomos estão envolvidos em diversas atividades celulares incluindo digestão, reparo da membrana e apoptose (Moore, 1982; Alberts *et al.*, 2007).

Diversos estudos revelaram que a permeabilidade da membrana lisossomal em vertebrados e invertebrados marinhos está associada às mudanças ambientais, principalmente à presença de poluentes (Lowe *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 1995; Moore, 1990; Moore *et al.*, 2006). Os lisossomos acumulam uma grande variedade de compostos tóxicos, incluindo as bifenilas policloradas (PCBs), os hidrocarbonetos

policíclicos aromáticos (HPAs) e os metais, podendo causar estragos na estrutura lisossômica, levando à ruptura de suas membranas limitantes e de vazamento do conteúdo hidrolase, bem como todas as toxinas acumuladas, para o citosol, podendo resultar em disfunção celular ou morte (Moore, 1982; Lowe & Pipe, 1994).

Danos lisossomais são expressos como um aumento na permeabilidade da membrana das lipoproteínas e estão bem estabelecidos como um biomarcador de estresse induzido pelo contaminante para uma gama diversificada de animais marinhos vertebrados e invertebrados (Moore, 1990).

Uma das mais técnicas comumente utilizadas em ensaios de citotoxicidade *in vitro*, foi desenvolvida por Borenfreund & Puerner (1985). Este ensaio quantifica o número de células viáveis e intactas após a sua exposição a tóxicos e baseia-se na absorção por difusão passiva e subsequente acumulação lisossomal do corante supravital, vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina cloridrato) (Figura 2.12), usando o tempo como determinante do efeito (Weyermann *et al.*, 2005).

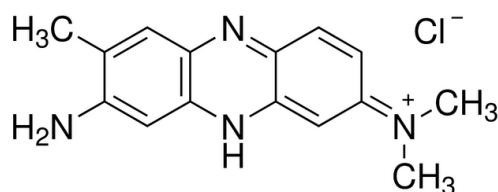


Figura 2.12 Estrutura do vermelho neutro.

O corante vermelho neutro é um composto lipofílico que se difunde passivamente através das membranas celulares (Figura 2.13). A molécula de vermelho neutro recebe um próton assim que entra no lisossomo, devido ao baixo pH desta organela. O vermelho neutro torna-se cada vez mais concentrado e visível, com coloração avermelhada, uma vez que se forma o gradiente de difusão do corante. A eficiência da retenção do corante depende do pH do lisossomo e da bomba de prótons Mg^{2+} ATPase encontrada na membrana lisossômica (Svendsen & Weeks, 1995). Em células saudáveis, esta bomba de prótons mantém o gradiente de prótons. De outro modo, se a eficiência das bombas reduzir, o fluxo de prótons diminui e o pH aumenta no interior lisossomal. Quando o pH atinge o valor do pKa do corante, este

desprotoniza e não é mais retido pelos lisossomos. Desta forma, o vermelho neutro concentrado difunde para fora das organelas e espalha-se rapidamente pelo citosol, obtendo um aspecto avermelhado. Portanto, qualquer coisa que altere o sistema da bomba de prótons acarretará na redução do tempo de retenção do vermelho neutro, uma vez que a duração do gradiente de prótons, mantido pelas bombas, será menor (Lowe *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 1995; Svendsen & Weeks, 1995).

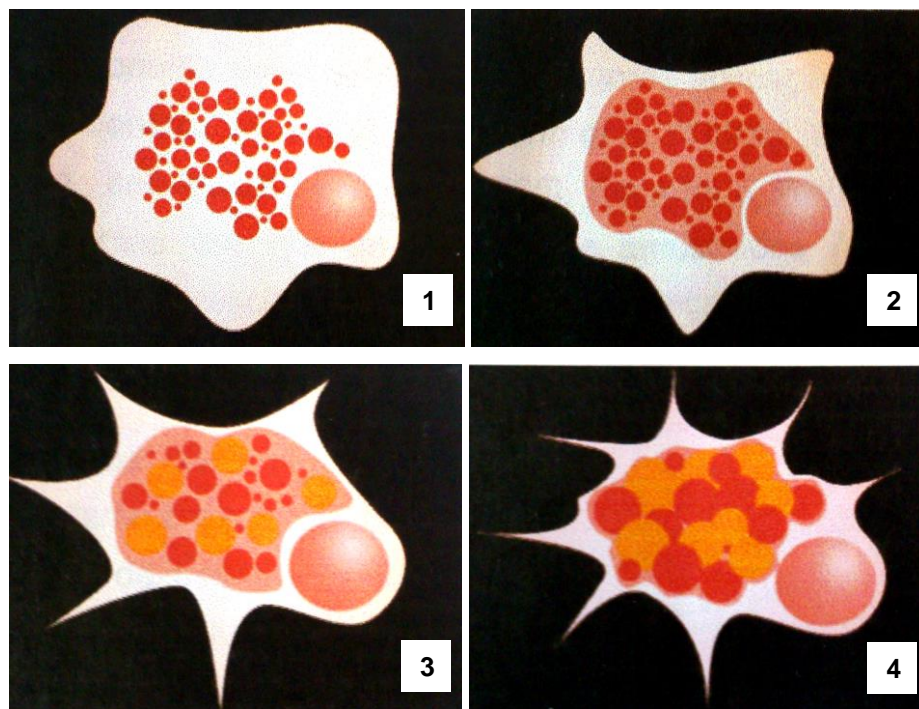


Figura 2.13 Etapas do ensaio do vermelho neutro: 1) concentração do vermelho neutro dentro dos compartimentos lisossomais; 2) aumento dos volumes destes compartimentos e difusão do corante para o citosol; 3) alteração na forma das células; 4) alterações estruturais na célula (Lima, 2001).

A capacidade das células de absorver e reter o corante tem sido usada em vários estudos como uma medida de citotoxicidade. Lowe *et al.* (1992) demonstraram o uso do ensaio do vermelho neutro como um indicador da exposição de contaminantes em hepatócitos de peixe *Limanda limanda* e foi desenvolvida a técnica para uso em células de mexilhões *Mytillus edulis* (Lowe & Pipe, 1994) como um indicador da saúde de invertebrados em laboratório e nos estudos de campo. Desde

então, diversos estudos tem sido conduzidos em organismos expostos a diferentes xenobióticos (Lima, 2001; Francioni *et al.*, 2007).

2.3.1.3. Micronúcleo

Micronúcleos (MN) são formados por condensação de fragmentos cromossomais ou de cromossomas inteiros que não estão incluídos no núcleo principal após a anáfase. São formados durante mitose ou meiose da divisão celular. Assim sendo, o MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico. Os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (Fenech, 2000).

Heddle (1973) e Schmidt (1975) afirmaram que os micronúcleos são formados no citoplasma através dos seguintes acontecimentos (Figura 2.14): (i) Em anáfase, a cromátide central e os fragmentos cromossômicos retardam quando elementos centéricos movem-se em direção aos pólos do fuso. Micronúcleos surgem a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos acêntricos que não são incorporados em núcleos das células filhas durante a mitose, pois carecem de um centrômero. (ii) Os elementos atrasados podem ser incluídos nos núcleos das células filhas, mas uma proporção forma um ou vários núcleos secundários que são muito menores do que o núcleo principal (1/5 a 1/20), e por isso são chamados micronúcleos. Estes aparecem separados, como um núcleo menor no citoplasma, além do núcleo principal da célula.

A formação de MN tem sido utilizada em epidemiologia molecular como biomarcador de danos cromossomais e instabilidade genômica de organismos marinhos expostos a uma variedade de compostos tóxicos e poluentes genotóxicos (Casini *et al.*, 2006; Fossi *et al.*, 2000), por ser um marcador de fácil avaliação.

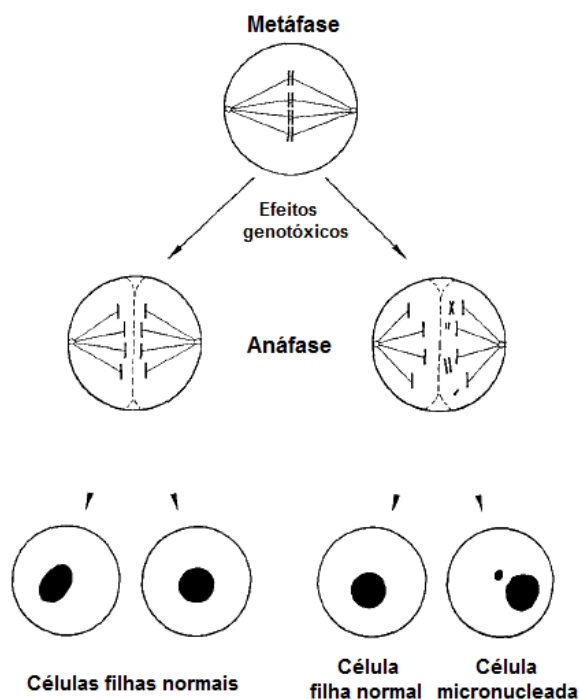


Figura 2.14 Mecanismo de formação do micronúcleo em uma célula mononucleada (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

2.3.1.4. Glutathiona

A glutathiona (GSH) desempenha um papel importante no sistema de defesa antioxidante e atua em processos celulares diversos, tais como a síntese de proteínas, metabolismo de aminoácidos e de transporte de peróxido (Meister & Anderson, 1983), e está envolvida na manutenção de um grande número de funções fisiológicas em células de vertebrados e invertebrados (Alcutt & Pinto, 1994). A diminuição da glutathiona pode reduzir a capacidade celular de destruir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, de modo que aumente o potencial oxidativo da célula. A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-*L*-cisteinil-glicina) que contém um grupo sulfidríla (-SH) presente na cisteína (Figura 2.15), conferindo grande capacidade redutora (Meister & Anderson, 1983).

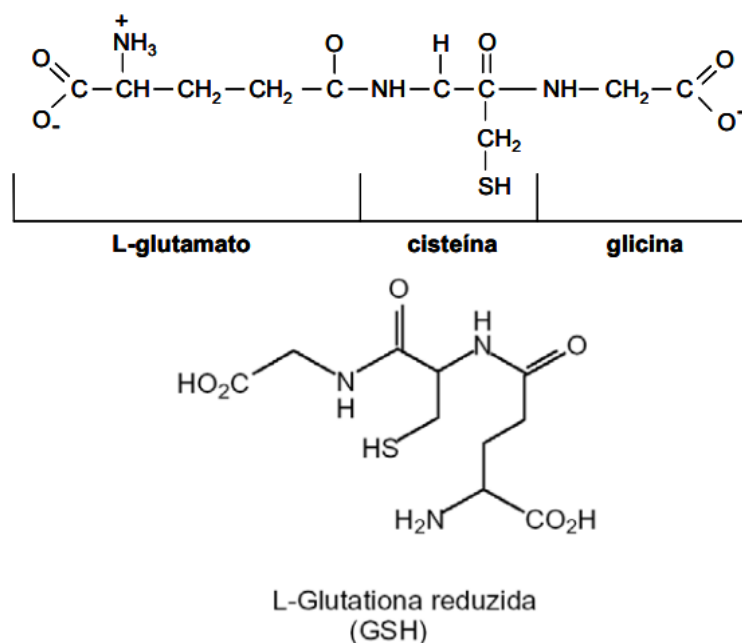


Figura 2.15 Estrutura e molécula de glutationa reduzida (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (modificado de Meister & Anderson, 1983).

Sua forma varia entre o tiol reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), na qual dois tripeptídeos de glutathione estão unidos por uma ligação dissulfeto. Para que a atividade protetora da glutathione, expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathione dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico (Figura 2.20). São três grupos enzimáticos envolvidos neste ciclo: a glutathione oxidase (GO), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (Grd). Segundo Kretzschmar (1996), o grupo sulfidríla interage com um radical livre para formar um radical glutathione, que por seguinte se emparelha com outro radical glutathione para formar a glutathione oxidada (GSSG), catalisada pelas enzimas GO e GSH-Px. A glutathione oxidada é então reciclada (reduzida) outra vez em glutathione reduzida (GSH) para reutilização por meio da enzima GR, que depende de NADPH como fonte de elétrons, estando, dessa forma, relacionada com a integridade da via das pentoses (ou ciclo das pentoses – PC) (Figura 2.16).

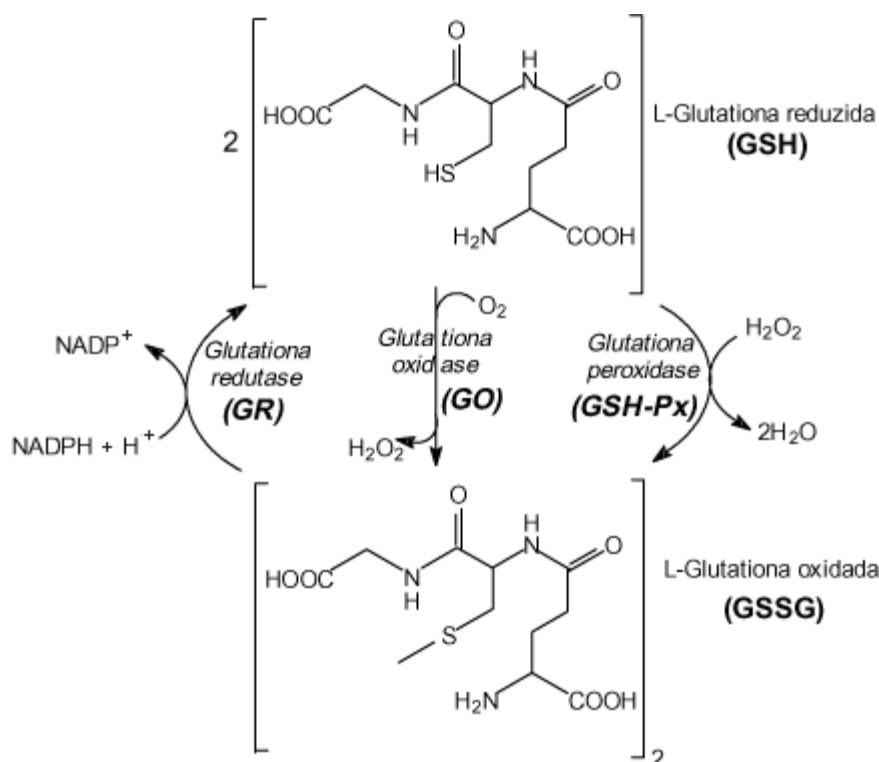


Figura 2.16 Esquema do ciclo catalítico da glutatona (Rover Júnior *et al.*, 2001).

Pouca se tem de informação sobre a concentração e distribuição de GSH em esponjas. Bachinski *et al.* (1997), que estudaram marcadores para estresse termal de identificação rápida em *Suberites domuncula*, a qual reage com o decréscimo na atividade da enzima GST e na concentração de GSH. Em relação aos poluentes, uma alteração adaptativa do sistema de GSH em resposta a contaminantes em brânquias do peixe *Fundulus heteroclitus* (Akaishi, 2003), bem como na resposta a chumbo no molusco bivalve *Mercenaria mercenaria*, tem sido relatada (Alcutt & Pinto, 1994).

A proteína GSH é utilizada como um substrato para a enzima glutathione-S-transferase (GST) para detoxificação de xenobióticos através da conjugação. A conjugação da glutathione com os xenobióticos é espontânea ou é catalisada pela GST, diminuindo a ação destes e tornando essas moléculas mais solúveis na água. As enzimas da GSH catalizam o grupo nucleofílico ligado a GSH, transformando-o em uma molécula que possui um átomo eletrofílico de carbono, nitrogênio ou enxofre (Field & Thurman, 1996; Hayes *et al.*, 2005). A indução intracelular da GST pode ser

feita por uma variedade de xenobióticos, incluindo pesticidas, bifenilas policloradas, metais e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs).

2.3.1.5. Histologia

A técnica histológica visa à preparação dos tecidos destinados ao estudo à microscopia. De uma maneira geral, diversas etapas são necessárias para o tratamento da amostra. Após a microtomia, os cortes de tecidos passam por coloração, que visa contrastar as estruturas teciduais. A ação da maioria dos corantes se baseia na interação entre os radicais ácidos ou básicos dos elementos químicos dos mesmos com os radicais iônicos dos tecidos, formando ligações eletrostáticas (Michalany, 1998). Também existem corantes específicos, como o picrossírius para o colágeno.

A coloração de hematoxilina-eosina (HE) é a mais tradicional na coloração combinada e representa a coloração histológica básica geral. A hematoxilina cora em azul (violeta) estruturas ácidas, como o núcleo das células. A eosina cora em vermelho o citoplasma e outras estruturas básicas (Michalany, 1998). A hematoxilina é um corante básico que carrega uma carga positiva. Corantes básicos reagem com componentes aniônicos das células e tecidos, como grupos fosfatos e grupos carboxila das proteínas. A hemateína age como corante, e esta é o produto da oxidação da hematoxilina, que por sua vez necessita de um mordente (sais de alumínio, ferro ou tungstênio) prévio ou incorporado à solução de hematoxilina. A hematoxilina cora em azul (violeta) estruturas ácidas, como o núcleo das células. A eosina cora em vermelho o citoplasma e outras estruturas básicas (Michalany, 1998).

O método de Picrossírius baseia-se na característica do corante Sirius Red de ser fortemente ácido devido aos seis grupamentos sulfônicos que contém. Estes reagem com os grupamentos amínicos das moléculas de lisina presentes no colágeno, de tal modo, que as moléculas do corante se dispõem paralelamente as moléculas alongadas de colágeno, orientadas normalmente em uma única direção. Essa orientação normal das moléculas de colágeno é responsável pela sua fraca birrefringência apresentada quando estudado com microscopia de polarização. Após a coloração com Sirius Red, a adição de grande quantidade de moléculas alongadas do

corante, leva a um aumento considerável da birrefringência das fibras colágenas. (Behmer *et al.*, 1976; Michalany, 1998).

Apesar das esponjas serem consideradas bioindicadoras de poluição, existem poucos estudos relacionando um determinado poluente com alteração histológica e nenhum estudo foi realizado com o objetivo de caracterizá-la como consequência dos efeitos de HPAs. Alguns trabalhos analisaram tecidos de esponjas como formas de avaliação dos efeitos de metais (Wagner *et al.*, 1998; Efremova *et al.*, 2002).

Esponjas não possuem tecidos típicos, como encontrados em outros animais multicelulares, e suas células ainda retêm um alto grau de totipotência (capacidade de diferenciação celular). As esponjas utilizam coanócitos para promover a circulação da água através de um sistema de canais exclusivo do filo, o sistema aquífero (Figura 2.17). Os coanócitos revestem as câmaras coanocitárias e são responsáveis pela geração da corrente de água que circula através do corpo da esponja (Brusca & Brusca, 2003). Estas células também estão relacionadas com a nutrição do animal, capturam o alimento por fagocitose e iniciam o processo digestivo no interior de vacúolos.

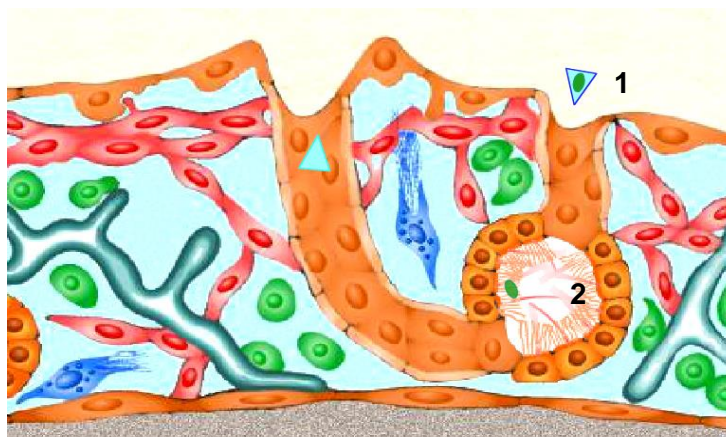


Figura 2.17 Sistema aquífero. (1) Filtração pela corrente produzida pelos coanócitos; (2) captura pelos coanócitos do alimento adsorvido na partícula (Porifera Brasil).

Os colêncitos são células especializadas da esponja, com morfologia e função semelhante aos fibroblastos de mamíferos. Estas células secretam o colágeno, proteína fibrilar da matriz extracelular, importante para a sustentação do corpo

multicelular animal (Brusca & Brusca, 2003). O esqueleto orgânico do filo Porifera é formado por fibras de espongina, uma proteína do tipo colágeno (Porifera Brasil).

2.3.2. Filo Porifera

As esponjas ou poríferos são animais filtradores e sésseis com morfologia simples e baixo grau de organização. O sucesso evolutivo foi conferido por sua grande adaptabilidade às variáveis ambientais, tornando-as um dos animais bentônicos mais abundantes e diversos. Dois atributos organizacionais definem seu sucesso: o sistema aquífero e a alta totipotência celular (Figura 2.18).

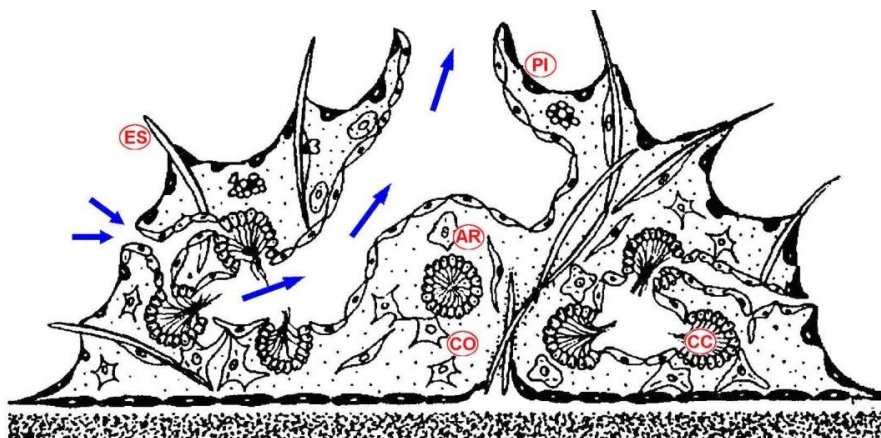


Figura 2.18 Estrutura interna de uma esponja e os principais constituintes: ES-espícula; PI – pinacócitos; AR – arqueócitos; CO – coanócitos; CC – câmaras coanocitárias (modificado de Exposito *et al.*, 2001).

As principais diferenças entre as classes de esponjas são a composição da espícula e o número de raios que a compõe e diversas configurações (Figura 2.19). A Classe Calcarea é caracterizada por esponjas com espículas de carbonato de cálcio e estas apresentam forma com um, três ou quatro raios (mono-, tri- ou tetraxônica). Enquanto as esponjas da Classe Hexactinellida possuem espículas de sílica com seis raios (hexactinal). Por último, as esponjas da Classe Demospongiae apresentam espículas silicosas, nunca com seis raios, com a estrutura de espículas suplementada ou substituída por uma rede de colágeno (espongina) (Bruca & Brusca, 2003).

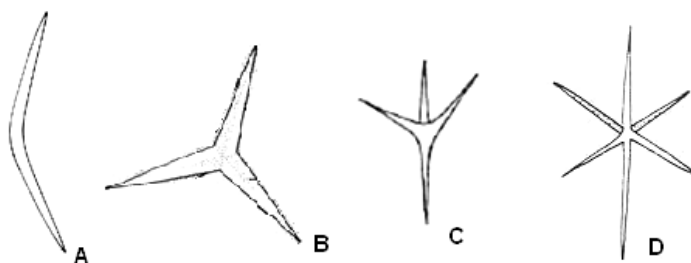


Figura 2.19 Tipos de espículas. (A) monoaxônica; (B) triaxônica; (C) tetraxônica; (D) hexactinal. (Brusca & Brusca, 2003).

As esponjas vivem em substratos consolidados em regiões tropicais, colonizando costões rochosos, recifes de coral e estruturas artificiais (Muricy *et al.*, 2008; Diaz e Rutzler, 2001). Os poríferos encontram-se amplamente distribuídos nos sistemas marinhos e ocorrem principalmente nas águas rasas da plataforma continental (Muricy & Hajdu, 2006). Das 8000 espécies descritas, cerca de 400 ocorrem no litoral brasileiro (Muricy *et al.*, 2008).

Os poríferos apresentam grande capacidade de filtração da água do mar, constituindo um complexo sistema que envolve simbiose com microorganismos. Com este sistema, as esponjas possuem capacidade de filtrar cerca de $100 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de água, embora não existam muitos registros de experimentos para medição desta capacidade para as diversas espécies (Vogel, 1977). Com isso, as esponjas são altamente expostas a substâncias mutagênicas e carcinogênicas presentes naturalmente no ambiente ou provenientes de fontes antropogênicas, podendo estar adsorvidas no material particulado, posteriormente, incorporado pelas esponjas. Uma vez inoculadas, as partículas contendo contaminantes adsorvidos, podem causar efeitos citológicos, histológicos e danos ao DNA, a curto e em longo prazo (Zahn *et al.*, 1981; 1983).

As esponjas desempenham importantes papéis ecológicos nos diferentes ecossistemas costeiros, contribuindo para a manutenção da biodiversidade: na estruturação do espaço físico, na competição por espaço, na bioerosão de substratos calcários, e servem como alimento para invertebrados e vertebrados (Diaz & Rützler, 2001; Wulff, 2012). A associação de alguns poríferos com cianobactérias os torna eficientes contribuintes para a produção primária nos sistemas marinhos (Rützler,

1990). Estes animais são também importantes recursos econômicos por produzirem compostos bioativos de grande interesse para indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos (Berlinck *et al.*, 2004; Vinothkumar & Parameswaran, 2013). Além disso, as esponjas também produzem metabólitos secundários como defesa química, que auxiliam na redução da predação (Ribeiro *et al.*, 2010). Os poríferos possuem ainda uma grande relevância em estudos de impactos ambientais devido à sua sensibilidade às variações da qualidade da água, tornando-os eficientes biomonitoradores de poluição doméstica e industrial (Alcolado, 2007). Uma significativa redução na biodiversidade dos poríferos já foi registrada em regiões sujeitas aos despejos domésticos, industriais e de poluentes térmicos (Muricy, 1989; Vilanova *et al.*, 2004).

Diversos estudos comprovaram que as esponjas acumulam eficientemente alguns poluentes, como os metais (Silva, 2010; Mestre *et al.*, 2012), PCBs (Denton *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2003), HPAs (Zahn *et al.*, 1982; Glyzina *et al.*, 2002; Fontes, 2011) e esteróis (Santalova *et al.*, 2012). A aplicabilidade das esponjas em estudos de biomonitoramento está concentrada principalmente no Mar Mediterrâneo e no Caribe (Alcolado, 2007; Pérez *et al.*, 2003; 2004; Cebrian *et al.*, 2003; Diaz & Rutzler, 2001). Apesar da relevância das esponjas em estudos ambientais ser mundialmente reconhecida, apenas dois estudos avaliaram a possibilidade de aplicá-las em programas de biomonitoramento de poluição orgânica e inorgânica na região costeira do Rio de Janeiro (Silva, 2010; Fontes, 2011).

2.3.2.1.

Escolha das esponjas como bioindicadoras

Para avaliar a exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos organismos aquáticos com maior exatidão, é pertinente detectar estes compostos em tecidos ou fluidos biológicos de organismos aquáticos (Watson *et al.*, 2004). Este parâmetro de biomonitoramento depende da absorção, biotransformação e excreção nestes organismos.

As altas taxas de filtração, assim como, a habilidade de ingerir partículas de 0.2 a 50 μm , permite que as esponjas capturem eficientemente os poluentes que se encontram na fase dissolvida e particulada na coluna d'água, e extraíndo da partícula

material como alimentação, incluindo matéria orgânica, bactérias e fitoplâncton (Vogel, 1977; Turon *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2004). Usualmente, o processo de bioacumulação nas esponjas pode variar em função da concentração no ambiente (Cebrian *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003). O primeiro estudo de biomonitoramento da contaminação por HPAs em esponjas foi feito após o derramamento de óleo oriundo do colapso do navio Amoco Cadiz na costa da Grã-Bretanha (Oudot *et al.*, 1981).

Zahn *et al.* (1981) estudaram a bioacumulação do benzo(a)pireno pela esponja *Tethya lyncurium* do Mar Adriático. Além de serem bioacumulados, também se ligavam às macromoléculas de DNA, RNA. Tal ligação era limitada pela luz e no escuro a molécula de benzo(a)pireno permanecia inalterada na esponja. A ligação benzo(a)pireno-DNA gera uma espécie de ‘buraco’ na sequência do DNA que desaparece em cinco dias após a transferência da esponja para um ambiente limpo. No entanto, a ligação diminuiu apenas parcialmente, enquanto a ligação dos compostos derivados do benzo(a)pireno com o DNA persistiu por semanas. Zahn *et al.* (1983), a partir dessas observações, concluíram que o reparo do DNA é responsável pelas mudanças descritas que sugerem a presença de mecanismos eficientes para a regeneração do DNA em esponjas da espécie testada, sujeitas à exposição aos HPAs. Adicionalmente, foi sugerido o uso das esponjas no processo de biorremediação de áreas contaminadas por HPAs (Glyzina *et al.*, 2002). Estes autores observaram que *Lubomirskia baikalensis* do Lago Baikal (Rússia) pode remover e acumular em 36 horas cerca de 90% do antraceno e pireno encontrados na água.

Os poucos estudos que testaram os efeitos destes poluentes nas esponjas, manipuladas em laboratórios, utilizaram espécies do Oceano Pacífico (Peachey & Crosby, 1996), do norte do Mar Adriático (Zahn *et al.*, 1981; 1982; 1983) e do lago Baikal (Glyzina *et al.*, 2002). Apesar de a região costeira possuir um grande histórico de contaminação por HPAs, um único estudo avaliou a possível aplicabilidade das esponjas marinhas como bioindicadoras deste tipo contaminação no Atlântico Sul (Fontes, 2011). A compreensão dos processos de incorporação e eliminação de HPAs, das propriedades que os regulam e dos efeitos que causam é necessária para avaliação da espécie como potencial biomonitora destes compostos.

2.3.2.2. Espécie estudada

Hymeniacidon heliophila (Porifera:Halichondrida) é uma esponja de cor alaranjada, com forma que varia de maciça a incrustante (Figura 2.20). Esta espécie possui projeções em forma de vulcão de 5 a 10 mm de altura e ósculos com 1 mm de diâmetro, presentes no topo das projeções. A esponja fixa-se diretamente ao substrato por uma base larga. A superfície rugosa é quase toda coberta por sedimento fino. O mesoólio é denso e o seu esqueleto é silicoso. O esqueleto coanossomal de *H. heliophila* pode ser composto por feixes ascendentes de espículas agrupadas por espongina e de espículas dispersas de forma aleatória (Muricy & Hajdu, 2006).



Figura 2.20 Espécime de *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910). Foto: T. Pedrete.

A esponja *H. heliophila* ocorre desde a Carolina do Norte (EUA) até Santa Catarina (Brasil) e na região entremarés de até 15 m de profundidade (Muricy & Hajdu, 2006) e é uma das primeiras espécies a colonizar as estruturas consolidadas em áreas de hipertrofia na Baía de Guanabara, considerada uma baía com poluição crônica (Muricy & Silva, 1999; Breves-Ramos *et al.*, 2005), sendo a mais resistente.

Um estudo sugere que os microrganismos oxidantes de amônia podem ser importantes na desintoxicação dos tecidos na esponja, aumentando a sua aptidão em ambientes impactados nas grandes cidades, onde muitas vezes contêm altas concentrações de amônia (Turque *et al.*, 2010). Estudos realizados em áreas degradadas na cidade do Rio de Janeiro apontaram esta espécie como bioindicadora de poluição e acumulam eficientemente contaminantes orgânicos e inorgânicos (Silva, 2010; Fontes, 2011).

3 Área de Estudo

A escolha da Baía de Guanabara, ambiente altamente industrializado e urbanizado como área de estudo deve-se ao fato de ser um local importante de abrigo de uma ampla variedade de espécies, servindo como um estuário para o crescimento de algumas destas. Além disso, a baía possui histórico de acidentes com petróleo e consequentes impactos ambientais, refletindo seu estado, atualmente, de contaminação crônica, especialmente por hidrocarbonetos do petróleo e por apresentar diversas fontes potenciais destes compostos. Outra área escolhida foi a lagoa de Itaipu, considerada neste trabalho uma área controle para realização do bioensaio de acumulação, por não apresentar histórico de impactos ambientais.

3.1. Baía de Guanabara

A Baía de Guanabara está localizada no Estado do Rio de Janeiro (Figura 3.1), e é um sistema estuarino altamente complexo por suas fontes naturais e antropogênicas. É a segunda maior baía do país, em extensão, possuindo uma superfície atual de 328 km² com um volume d'água de cerca de 2 milhões de m³. A bacia de drenagem tem uma área aproximada de 4000 km² e suas descargas fluviais são provenientes de dezenas de rios, sendo os maiores com nascentes na Serra do Mar ou no maciço litorâneo, que rodeiam a baía (Kjerfve *et al.*, 1997; Weber, 2001, da Costa, 2003). Sua bacia hidrográfica é composta por 45 rios e riachos com carga média anual de até 230,2 m³ s⁻¹ (JICA, 1994), sendo sua maior largura, de 28 km, está entre a foz dos rios São João de Meriti e Macacu. A profundidade média é de 7,6 m e a região mais profunda, com cerca de 50 m, localiza-se entre as pontas de São João e de Santa Cruz (Amador, 1997; Kjerfve *et al.*, 1997) (Figura 3.1).

agravamento da qualidade de água, havendo uma melhoria da qualidade desta região para a margem leste e principalmente em direção à entrada da barra, no canal central da baía.

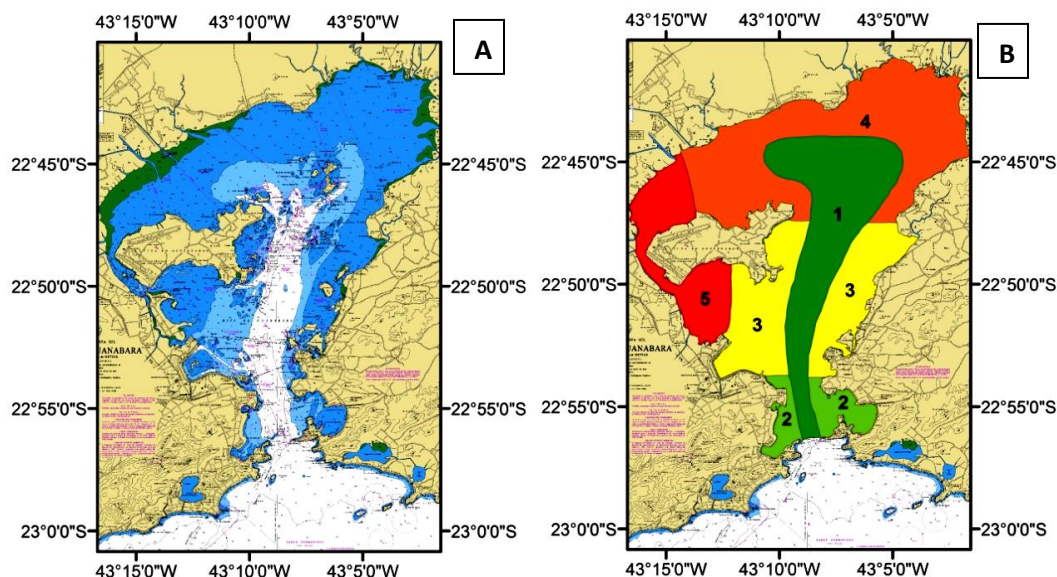


Figura 3.2 Caracterização das águas da Baía de Guanabara (adaptado de Mayr, 1998):
 1 - Canal principal de navegação – melhores condições de qualidade de água em função da grande contribuição oceânica; 2 - Entrada da baía – cidades do Rio de Janeiro e Niterói, com poluição doméstica; 3 - Caracterizada por forte deterioração ambiental; 4 - Seção nordeste – região de aporte de rios menos poluídos; 5 - Seção noroeste – área mais deteriorada em função das diversas fontes de poluição.

A Baía de Guanabara engloba 14 municípios, abrangendo os maiores centros urbanos, e concentra a maioria das indústrias de grande porte e, por isso, é caracterizada por uma ocupação de alta densidade demográfica, sendo a parte sudoeste com maior adensamento populacional, devido à região metropolitana do Rio de Janeiro, enquanto a porção nordeste possui a menor densidade (JICA, 1994). O processo de ocupação populacional na sua bacia de drenagem é responsável por mudanças profundas na Baía de Guanabara (Kjerfve *et al.*, 1997). Os problemas de poluição nas águas da baía se intensificaram principalmente a partir da década de 1950, quando ocorreu um aumento na densidade populacional sem planejamento

urbano e também foi estabelecido um dos maiores pólos industriais brasileiros na região (Lima, 1996).

Uma das principais causas da poluição das águas da baía é o aumento no aporte de matéria orgânica e de contaminantes orgânicos e inorgânicos, que levaram a uma queda acentuada na qualidade das águas da baía e de seus rios afluentes (JICA, 1994). Este ambiente estuarino recebe diariamente cerca de 400 ton de efluentes orgânicos, onde apenas uma pequena parte recebe algum tipo de tratamento (PDBG, 2000). As taxas de assoreamento são resultantes do crescente transporte de partículas e foram intensificadas devido às obras de canalização dos rios, favorecendo o transporte de sedimentos, ao desmatamento generalizado das bacias de drenagem, que intensificou a erosão e o fornecimento de carga sólida para os rios e aos aterros, responsáveis por reduções diretas na área da Baía de Guanabara (Amador, 1980).

Os principais impactos ambientais decorrem da eutrofização, responsável pela diminuição da concentração de oxigênio e por problemas de saúde pública, das elevadas concentrações de metais e hidrocarbonetos de petróleo e das alterações na estrutura de comunidades pelágicas e bentônicas (Azevedo, 1998; Hamacher, 1996; Lima, 1996). Os grandes aportes de nutrientes, principalmente de esgotos domésticos (vazão de $20 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$), levaram a eutrofização das águas da baía, o que resultou na elevação da estocagem de matéria orgânica (Carreira, 2000). A estimativa é de que aproximadamente 600 toneladas diárias de esgoto doméstico ainda são lançadas sem tratamento na baía (Marque-Junior *et al.*, 2009).

A Baía de Guanabara engloba o 2º maior parque industrial do país, com 14000 indústrias, possuindo também 16 terminais marítimos de petróleo, dois portos comerciais, estaleiros, postos de combustível, uma das maiores refinarias do país, a Refinaria de Duque de Caxias, a Reduc, e outras fontes poluidoras que contribuem diariamente com óleo, fenóis, metais pesados e outros poluentes tóxicos (Figura 3.3). As indústrias no entorno da baía representam um dos principais fatores de contaminação da baía (Marques-Junior *et al.*, 2009) e contribuem com cerca de 20% da carga orgânica (maioria de substâncias tóxicas) que é despejada nela, principalmente nas regiões oeste e noroeste. De acordo com o Relatório de Controle Ambiental do PDBG (2000), aproximadamente 10.000 toneladas de resíduos

perigosos são gerados mensalmente na bacia hidrográfica da Baía de Guanabara, sendo os óleos usados (31%), metais pesados (11%) e solventes (3%) os principais compostos.

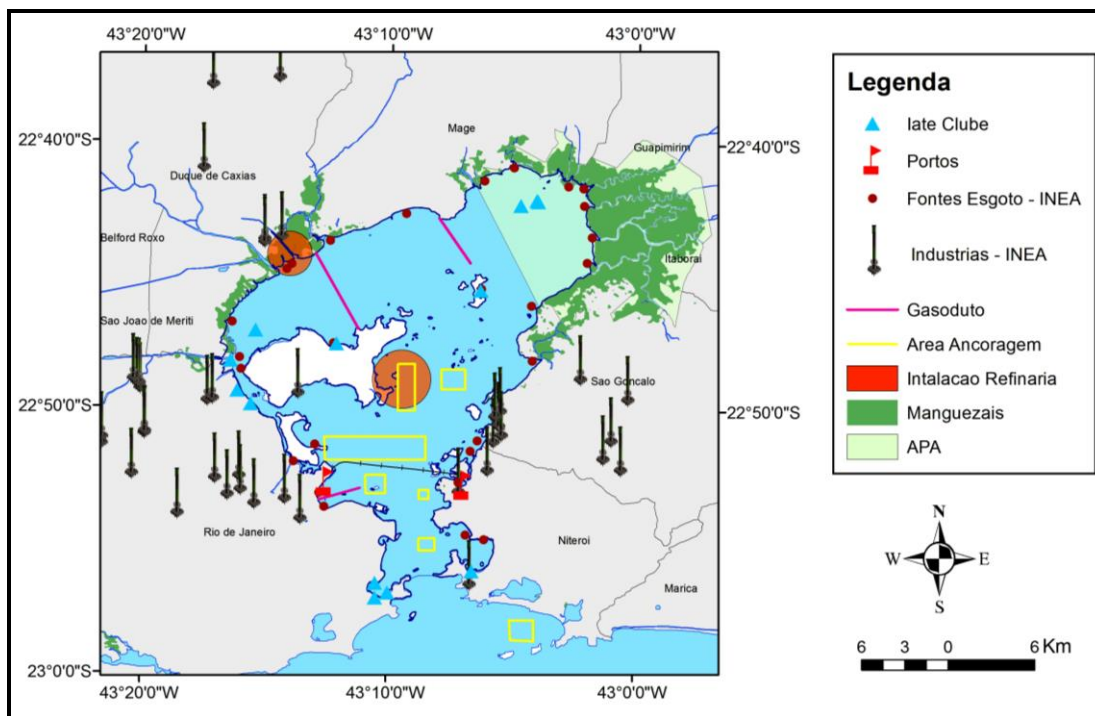


Figura 3.3 Fontes de contaminação na Baía de Guanabara (adaptado de JICA, 1994).

Em relação ao petróleo e seus derivados, as fontes de poluição na Baía de Guanabara podem causar efeitos crônicos ou agudos. Há um alto risco de acidentes por derramamento de petróleo e derivados devido a estas fontes citadas e também aos oleodutos quilométricos que atravessam a Baía de Guanabara, bombeando dezenas de milhões de litros de óleo e derivados para abastecer os terminais, navios, petroleiros e balsas (da Costa, 2003). A baía sofreu com diversos acidentes com petróleo, e o mais importante deles, foi o ocorrido em 18 de janeiro de 2000, quando aproximadamente 1300 m³ de óleo combustível marítimo (MF-380) vazaram na Baía de Guanabara, devido à ruptura de uma tubulação na Reduc. Grande quantidade de óleo atingiu praias e mangues, situadas principalmente no norte e nordeste da baía. Os resultados pré- e pós-derrame mostram que não houve impacto significativo no sedimento e na coluna d'água da Baía de Guanabara (Meniconi *et al.*, 2002).

Com o passar dos anos, os problemas ambientais na baía tomaram dimensões cada vez maiores, o que alertou a sociedade para necessidade de estabelecer medidas mitigadoras por parte dos órgãos ambientais (Marques Jr. *et al.*, 2009). A Baía de Guanabara é um dos sistemas costeiros que possui o maior número de informações no Brasil, e apesar disso, ainda são encontradas dificuldades para compreender e caracterizar detalhadamente as alterações ambientais ocorridas nas últimas décadas, pois é um sistema estuarino complexo, com padrão de circulação de água diversificado e com múltiplas fontes de contaminantes.

3.2. Itaipu

A região costeira de Itaipu (Figura 3.4), situada no município de Niterói, abriga uma tradicional colônia de pescadores. A área está localizada no oeste da boca da Baía de Guanabara, sendo assim, peculiar por concentrar diferentes habitats, e forma uma enseada. Próximo à praia existe um conjunto de ilhas costeiras (Menina, Mãe e Pai) que protegem parcialmente a enseada do batimento das ondas, influenciando a sedimentação e a morfologia do fundo, o que beneficia a pesca artesanal (Monteiro-Neto *et al.*, 2008). A massa de água costeira é uma mistura de águas da Baía de Guanabara, das lagoas de Itaipu e de Piratininga e das águas costeiras oceânicas, influenciadas sazonalmente pela ressurgência das águas centrais do Atlântico Sul (Tubino *et al.*, 2007).

A profundidade da água varia de um mínimo de 3-4 m logo após a arrebentação até um máximo de 28 m. Itaipu é um ambiente clástico com ondas, tendo uma variação de maré semidiurna com uma flutuação máxima de 1,4 m e a velocidade das correntes raramente excedem 10 cm s^{-1} (Santos *et al.*, 2004).

O arco praial Camboinhas/Itaipu formava um único arco com 3300 m de extensão. Este foi posteriormente dividido em duas praias, denominadas Camboinhas e Itaipu, em função da abertura do Canal de Itaipu para circulação da lagoa de Itaipu e escoamento da lagoa de Piratininga (ligadas pelo canal de Camboatá) (Santos *et al.*, 2004; Weber, 2001).

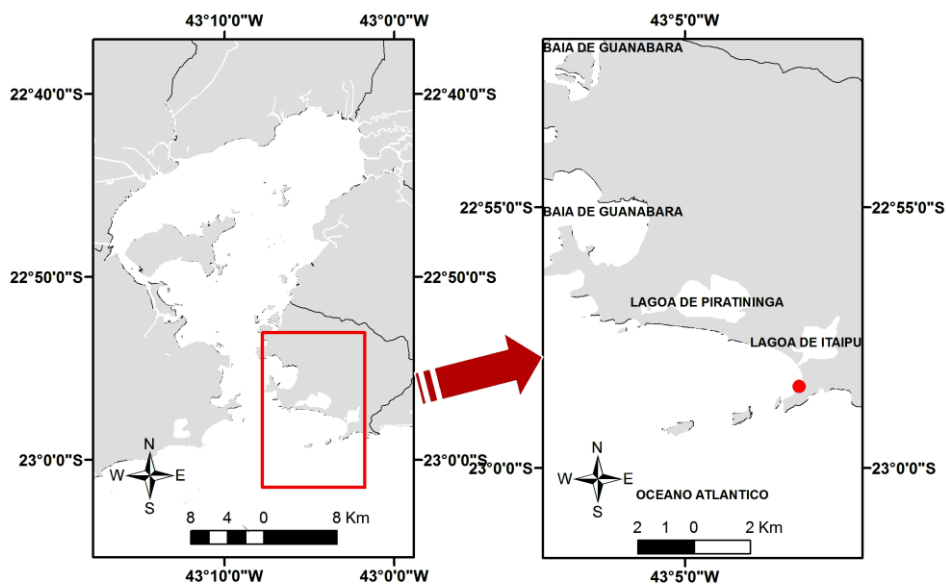


Figura 3.4 Localização da região costeira de Itaipu.

As lagoas de Itaipu e de Piratininga são uma das mais importantes áreas de turismo e lazer do Estado do Rio de Janeiro, na região oceânica de Niterói e abrangem os bairros de Itaipu, Piratininga, Cambinhas e Cafubá. O complexo lagunar Itaipu-Piratininga representa um habitat específico, propício à reprodução e/ou crescimento de espécies marinhas ou estuarinas dependentes (Monteiro-Neto *et al.*, 2008). Essas lagoas sofrem extensas modificações antrópicas com reflexos significativos em sua geomorfologia, transformando-a em uma laguna e mudando algumas características da biota local (Fonseca, 2001).

O bairro de Itaipu não possuía uma rede geral de esgotos, apenas em 2004 recebeu uma estação de tratamento de esgoto, e a maioria dos moradores utilizava como alternativa o sistema de fossas sépticas. Assim, havia lançamento de esgoto *in natura* diretamente no corpo lagunar que pode atingir a praia já que a renovação de sua água é fortemente controlada pelas marés (Weber, 2001), ocorrendo uma entrada de contaminantes na enseada. Não existem relatos de acidentes com petróleo e derivados nesta região.

4 Materiais e Métodos

4.1. Materiais empregados

Solventes: Diclorometano, acetona, ciclohexano e hexano utilizados nos procedimentos para análise de HPA foram obtidos da Mallinckrodt® de grau pesticida.

Reagentes: O detergente utilizado para limpeza das vidrarias foi o Detertec 7 neutro (Vetec). Os reagentes utilizados nos procedimentos para análise de HPA foram Sulfato de sódio anidro, grau P.A. (Merck®), descontaminado em mufla a 450°C por 6 horas e mantido em estufa a 160°C; alumina (óxido de alumínio 90 ativo, neutro, Merck®, 0,063 – 0,200 mm), descontaminada em mufla a 450 °C por 6 horas e 2% desativada com água Milli-Q (Direct-Q3 da Millipore); Sílica-gel (G60, Merck®, 0,063 – 0,200 mm), descontaminada em Soxhlet por 6 horas em diclorometano e armazenada em estufa a 160°C e 5% desativada. Os reagentes utilizados para determinação do oxigênio dissolvido foram: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KI, KOH e amido solúvel (P.A. ACS); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS ISO, REAG. PH. EUROPÉIA) e KIO_3 e H_2SO_4 (P.A.), todos da Vetec Química Fina. Para a extração celular e ensaio do vermelho neutro foram utilizados os seguintes reagentes: Hepes, EDTA (sal dissódico, P.A. ACS), NaCl (P.A. ACS ISO, REAG. PH. EUROPÉIA), KCl e Na_2SO_4 (ambos P.A. ACS); e Hepes, CaCl_2 e MgSO_4 (puríssimos), NaCl e KCl, respectivamente, todos da Vetec Química Fina. O ajuste de pH das soluções foi feito com NaOH (lentilhas P.A. – Vetec Química Fina). Os produtos utilizados para o teste de micronúcleo foram Poli-L-Lisina da Sigma, tabletes para tampão pH 6.4 da Merck Millipore, corante Giemsa da Sigma-Aldrich®, solução Entellan da Merck® e óleo de imersão da Sigma. O DMSO para o preparo da solução estoque do vermelho neutro e da solução para exposição foi obtido da Sigma-Aldrich®. Os padrões de HPA, *p*-terfenil e padrões

internos foram obtidos da Accustandard (New Haven, EUA). Todos os reagentes utilizados para a análise de GSH foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

Vidraria: Toda a vidraria utilizada foi lavada com Detertec e água deionizada e descontaminada em mufla a 450°C por 6 horas.

4.2.

Biomonitoramento passivo com a esponja *Hymeniacidon heliophila* da Baía de Guanabara

A coleta foi realizada em fevereiro e março de 2011, representando a estação chuvosa. Os dados obtidos foram comparados com os da estação seca reportados por Fontes (2011), para os mesmos locais de coleta. Os pontos de amostragem e posterior tratamento das amostras são ilustrados nas Figura 4.1 e 4.2, respectivamente.

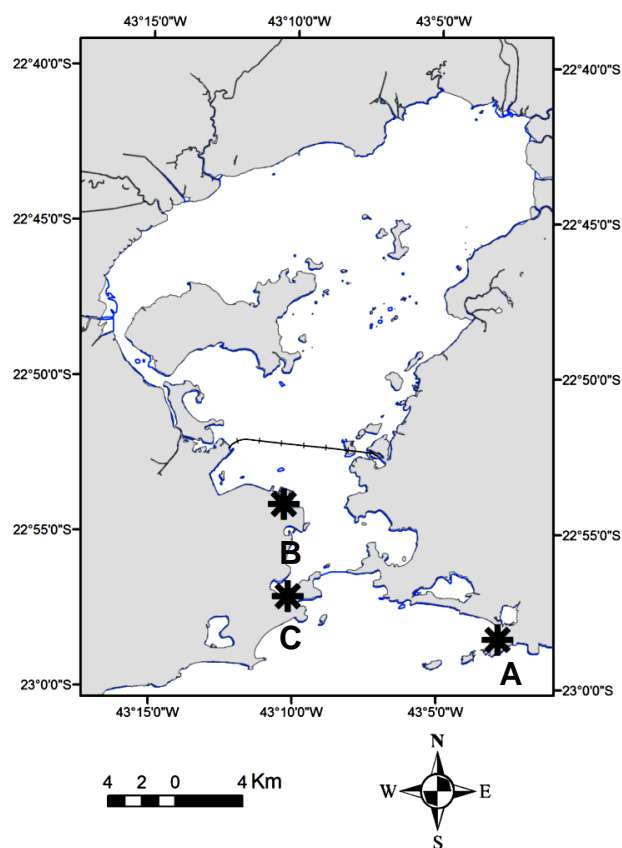


Figura 4.1 Locais de coleta da estação chuvosa. A – Itaipu; B – Praça XV; C – Urca.

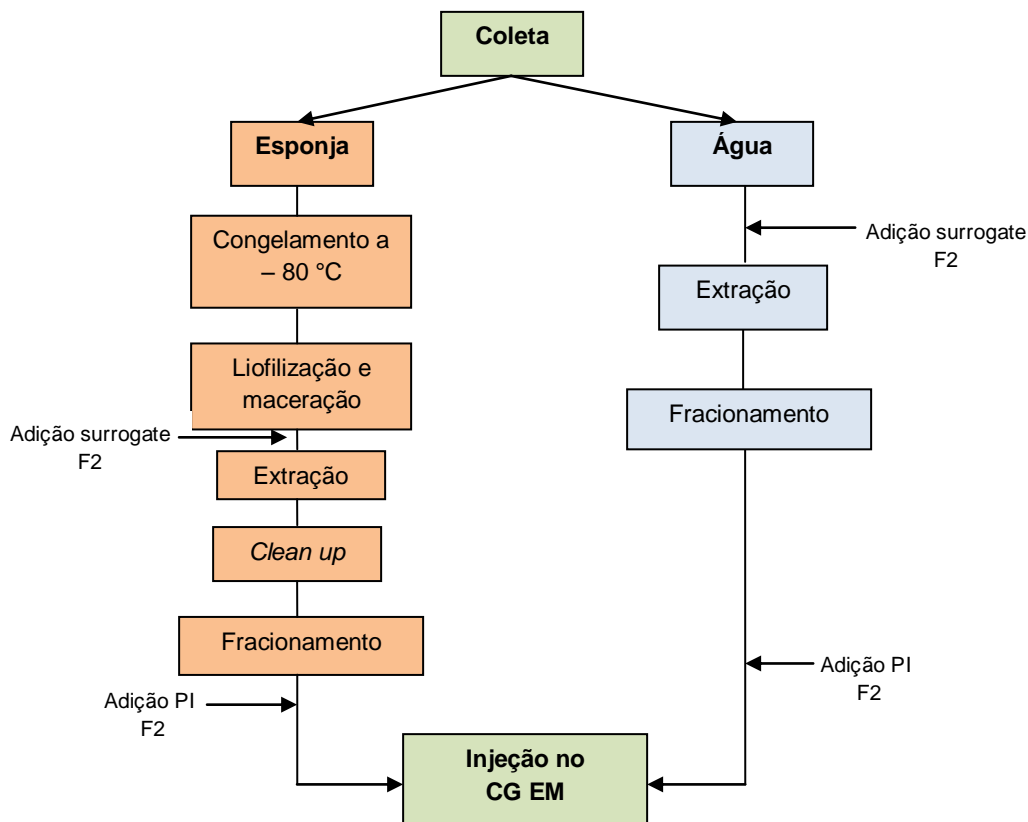


Figura 4.2 Diagrama de tratamento das amostras de esponjas e água.

4.2.1. Amostragem de água

Para avaliar o fator de acumulação (relação da concentração do composto no organismo para a concentração do composto na água), a amostragem de água foi realizada nos mesmos pontos onde se deu a coleta das esponjas.

A coleta de amostras de água foi feita com garrafas de 4 L, em triplicata, submergindo-as fechadas para não ter o risco de contaminação com a camada superficial, contendo biofilme. As garrafas, então, foram abertas embaixo d'água e fechadas antes de emergirem. As amostras foram devidamente identificadas, de acordo com o local de amostragem, conservadas em gelo e foram transportadas ao laboratório em caixas térmicas, mantendo-se a integridade das mesmas.

4.2.2.

Procedimento de coleta da esponja *H. heliophila*

As esponjas (cerca de 20 g) foram coletadas com auxílio de faca e espátulas, e os organismos foram imediatamente, colocados em potes contendo água do mar do local e protegidos. No laboratório, as esponjas foram limpas em um recipiente com água do mar, retirando impurezas, como sedimento e organismos epifíticos. O número total de esponjas coletadas foi 26, sendo 8 em Itaipu, 8 na Praça XV e 10 na Urca.

4.2.3.

Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em tecido de *H. heliophila* por CG/EM

A determinação de HPAs em tecidos de esponja segue método adaptado por Nudi *et al.* (2010). Amostras de esponjas foram congeladas a -80°C para posterior liofilização das mesmas (liofilizador ModulyoD da Thermo). Após a liofilização, as amostras foram maceradas em cadinhos de porcelana, previamente descontaminados, a fim de se obter a homogeneização.

4.2.3.1.

Extração e teor de lipídios

A extração dos hidrocarbonetos a partir das amostras de tecido foi realizada seguindo o método EPA-3540C com modificações. Pesaram-se cerca de 1,5 g da amostra liofilizada em cartucho de celulose (previamente descontaminado com diclorometano por seis horas) e uma alíquota de 50 μL de surrogate de F2 (fração aromática) *p*-terfenil- d_{14} ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionada em cada amostra. A extração foi realizada em sistema Soxhlet em balões de 250 mL (Figura 4.3) por 24 horas, com 200 mL de diclorometano. Após a extração, o volume do extrato foi reduzido no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences), e transferido para uma proveta, aferido a 10 mL com diclorometano.



Figura 4.3 Extração das amostras de esponja em Soxhlet por 24h. Foto: T. Pedrete.

Deste volume, 2 mL foram cuidadosamente transferidos para vidros de relógio previamente pesados, levados à estufa, a 70-80°C, para avaliação do teor de lipídios. As amostras foram pesadas repetidamente e recolocadas na estufa até atingirem peso constante (variação máxima de $\pm 0,001$) em balança Mettler A 200 com quatro casas decimais de precisão. O cálculo do teor de lipídios foi obtido, conforme as eq. (4.1), (4.2) e (4.3).

$$\text{Quantidade de lipídio} = \frac{(\text{peso amostra com frasco} - \text{peso frasco})}{\text{volume para lipídio (2 mL)}} = g \cdot mL^{-1} \quad (4.1)$$

$$\text{Massa para lipídio} = \frac{\text{massa extraída} \times \text{volume lipídio (2 mL)}}{\text{volume total extrato (10 mL)}} = g \quad (4.2)$$

$$\text{Teor de lipídios} = \frac{\text{quantidade de lipídios}}{\text{massa para lipídio}} \times 100 = \% \quad (4.3)$$

4.2.3.2. **Clean up lipídios**

Após a etapa de extração, foram realizadas duas etapas de *clean up*, utilizando coluna de alumina, seguida de cromatografia por permeação em gel, para redução do teor de lipídios.

1) Pré-fracionamento com coluna de alumina

A coluna de vidro de 2,2 cm de diâmetro interno e 30 cm de comprimento (Figura 4.4), previamente descontaminada com acetona e diclorometano, foi preenchida com 2/3 de diclorometano, para verter 20 g de alumina 2 % desativada. Após o assentamento da alumina, eluiu-se o diclorometano até o topo da coluna, e lava-se a coluna com 50 mL de hexano. O extrato da amostra foi adicionado ao topo da coluna e os analitos eluídos com diclorometano (100 mL). O eluído foi recolhido, reduzindo o volume no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences).

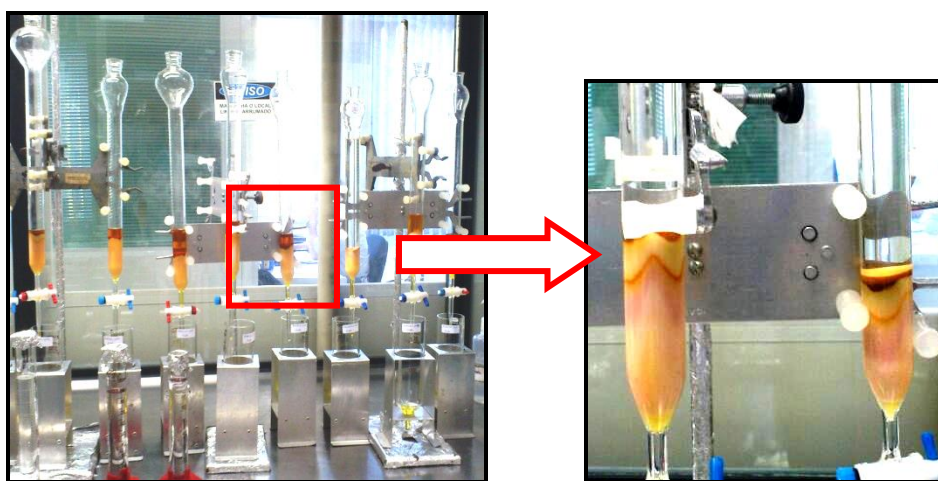


Figura 4.4 Procedimento de coluna grossa. Foto: T. Pedrete.

2) Cromatografia por permeação em gel (*Gel Permeation Chromatography* GPC)

Após a primeira etapa de *clean up*, o solvente dos extratos foi trocado para solução de acetona:ciclohexano (3:7, v/v) sob N_2 . A amostra foi filtrada em cartuchos descartáveis MillexTM (MILLIPORE, membrana de politetrafluoretileno - PTFE 0,45 μ m de poro e 22 mm de diâmetro) e rinsada com solução acetona:ciclohexano (3:7, v/v). Em seguida, a amostra (2 mL) foi injetada no sistema GPC (Tabela 4.1), para que não houvesse interferentes na determinação por cromatografia gasosa com espectrometria de massas. A otimização dos tempos de corte dos lipídios e os de retenção das amostras foi baseada em uma solução padrão de referência, CLP-027, diluída em diclorometano e trocada para acetona/ciclohexano (3:7), contendo:

metoxiclor, perileno, enxofre, ftalato e óleo de milho. O tempo total da corrida no aparelho foi de 60 min, e a amostra foi recolhida a partir de 13 min e 30 s, seguindo a padronização do método. Após o recolhimento da amostra, reduziu-se o volume desta em evaporador rotatório e o solvente foi trocado para hexano sob N₂, para posterior fracionamento dos compostos alifáticos e aromáticos em coluna de sílica-gel.

Tabela 0.1 Condições instrumentais do sistema cromatográfico GPC.

Equipamento	GPC LC-10AD Shimadzu CBM
Coluna	Shodex CLNpak EV2000
Detector	Fluorescência SPD-10AV Shimadzu
Comprimento de onda (λ)	254 nm
Solvente	Acetona : Ciclohexano
Gradiente fase móvel	30% Acetona 70% Ciclohexano
Fluxo	4,0 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	2 mL

4.2.3.3.

Fracionamento dos compostos aromáticos

Para realizar este processo, foi empregada uma coluna fina de vidro (Figura 4.5) de 1,3 cm de diâmetro interno com 30 cm de comprimento, previamente descontaminada. A coluna, contendo 1/3 de diclorometano, foi preenchida com 7g de alumina 2% desativada, 10g de sílica 5% desativada e 1 g de sulfato de sódio para remover qualquer resquício de água. Eluiu-se o diclorometano até o topo da coluna e trocou-se o solvente com 20 mL de hexano. Após adição da amostra na coluna, a fração 1 (F1- compostos alifáticos) foi eluída com 35 mL de hexano e descartada. A fração 2 (F2 - compostos aromáticos) foi recolhida depois da eluição de 75 mL da solução diclorometano: hexano (1:1, v/v). O extrato foi recolhido e reduzido no

sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences), concentrando a amostra a 1 mL, sob N_2 , e acrescentando-se 25 μ L do padrão interno da fração 2 (PI F2).



Figura 4.5 Fracionamento dos compostos em coluna de sílica-gel. Foto: T. Pedrete.

4.2.3.4. Quantificação

A metodologia utilizada para a determinação dos HPAs por cromatografia em fase acoplada a espectrômetro de massas (CG EM), seguiu, com algumas modificações, o método EPA-8270D. A quantificação incluiu os 16 HPAs controlados pelo método (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), além do dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno. Além destes compostos também foram quantificados os seguintes HPAs alquilados: C1 a C4 naftalenos, C1 a C3 fluorenos, C1 a C3 dibenzotiofenos, C1 a C4 fenantrenos, C1 e C2 pirenos, e C1 e C2 crisenos, totalizando 37 compostos. O C1 naftaleno é resultado da soma do 1-metil e 2-metilnaftalenos.

A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como padrão interno uma mistura de concentração igual a 4 μ g mL⁻¹, contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂. Devido à dificuldade de

obtenção de padrões de HPAs alquilados, estes foram determinados utilizando-se a curva de calibração dos seus homólogos não alquilados. Soluções padrão foram utilizadas em duas faixas para quantificação: uma para baixos níveis de concentração (2, 5, 10, 20, 50 e 100 ng mL⁻¹) e outra para altos níveis de concentração (50, 100, 200, 400 and 1000 ng mL⁻¹). Uma correlação linear ($R^2 > 0,990$) foi obtida para as curvas de calibração realizadas. Para cada conjunto de amostras analisadas, uma solução padrão foi injetada a fim de verificar condições instrumentais de calibração. Um branco analítico era analisado a cada injeção de um lote de amostras.

Todas as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico CG EM (Figura 4.6), sob os mesmos parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 4.2.



Figura 4.6 Cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas. Foto: T. Pedrete.

Tabela 0.2 Condições instrumentais do sistema cromatográfico CG EM.

Equipamento	CG – Thermo Finnigan modelo TraceGC EM - Thermo Finnigan modelo Polaris Q
Coluna	J&W DB-5ms (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme)
Programa de temperatura	50 °C durante 5 min 5 °C min ⁻¹ até 80 °C 6 °C min ⁻¹ de 80 °C a 280 °C 280 °C durante 25 min
Gás de arraste	Hélio 1,2 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	1,4 µL

O limite de quantificação do método para cada HPA foi calculado utilizando-se a menor concentração da curva de calibração (2 ng mL^{-1}) e dividindo-a pela massa média de amostra. O limite de detecção para compostos individuais consiste em três vezes o desvio padrão da injeção de uma série de 8 réplicas de uma solução de um padrão, cuja altura do pico cromatográfico esteja compreendida entre três e dez vezes o ruído. O limite de detecção é função das condições do equipamento, bem como do volume de amostra usado na extração.

4.2.4.

Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água por CG/EM

4.2.4.1.

Extração

Amostras de água (aproximadamente 4L cada) foram submetidas ao procedimento de extração dos hidrocarbonetos, baseada no método EPA-3510C. Antes de iniciar as extrações, uma alíquota de 100 μL de surrogate de F2 (*p*-terfenil- d_{14} , $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionada. A adição destes padrão avalia o desempenho da metodologia empregada, que é considerada adequada caso a recuperação esteja na faixa entre 40 e 125 % (Sauer & Boehm, 1995).

A extração foi realizada inicialmente com 150 mL de MeCl_2 por agitação da mistura (150 rpm) por cerca de 3 min em mesa agitadora TE-1401 da Tecnal, seguida de repouso por 10 min, conforme ilustrada na Figura 4.7. A fase orgânica foi recolhida em frasco de vidro e todo o procedimento foi repetido por mais duas vezes, com 100 mL de diclorometano cada.

Após extração com diclorometano, o volume do extrato foi reduzido para cerca de 5 mL no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences), sob fluxo de N_2 . Durante este processo, procedeu-se à troca do solvente da extração (MeCl_2) para hexano para posterior fracionamento das frações alifáticas e aromáticas.

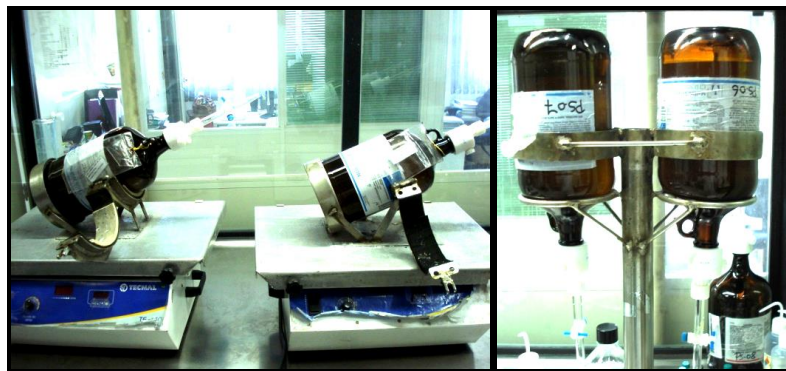


Figura 4.7 Procedimento de extração de amostra de água de 4L. Foto: T. Pedrete.

4.2.4.2.

Fracionamento dos compostos aromáticos e quantificação

A separação da fração aromática no extrato bruto é a mesma realizada para os tecidos, conforme descrito no item 4.2.3.3. A fração aromática foi concentrada no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences) e o padrão interno de quantificação (Naf-d₈, Ace-d₁₀, Fen-d₁₀, Peril-d₁₂, Cris-d₁₂, 4 µg mL⁻¹) foi adicionado. As amostras foram avolumadas a 1 mL com diclorometano. A adição de padrão interno é importante, a fim de assegurar-se da padronização das condições de análise. A quantificação dos HPAs foi baseada no método descrito no item 4.2.3.4.

4.3.

Biomonitoramento ativo com a esponja *Hymeniacidon heliophila*

A coleta foi realizada em maio e julho (depuração) e dezembro (acumulação) de 2012. Parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido e temperatura, foram aferidos, a fim de se obter uma realidade próxima do ambiente natural das esponjas durante os bioensaios. Os pontos de amostragem dos dois tipos de bioensaio são ilustrados na Figura 4.8. Diversos procedimentos foram aplicados nas amostras de esponja, água e filtro para análise de HPAs (Figura 4.9).

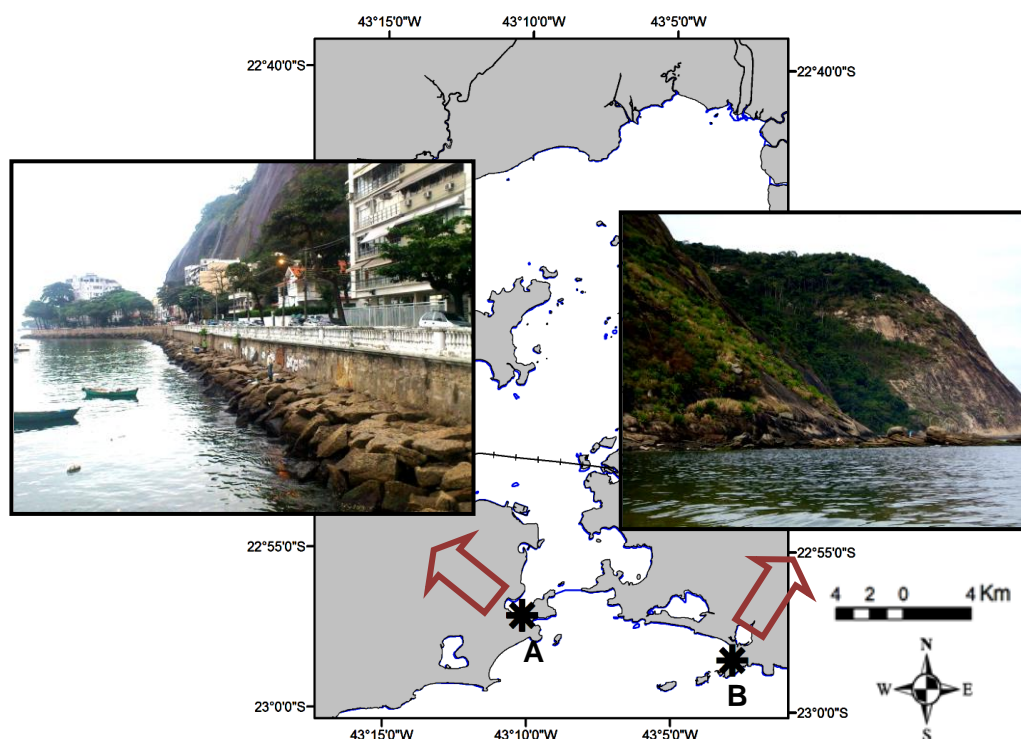


Figura 4.8 Pontos de coleta para os bioensaios. (A) Urca; (B) Itaipu. Fotos: T.Pedrete.

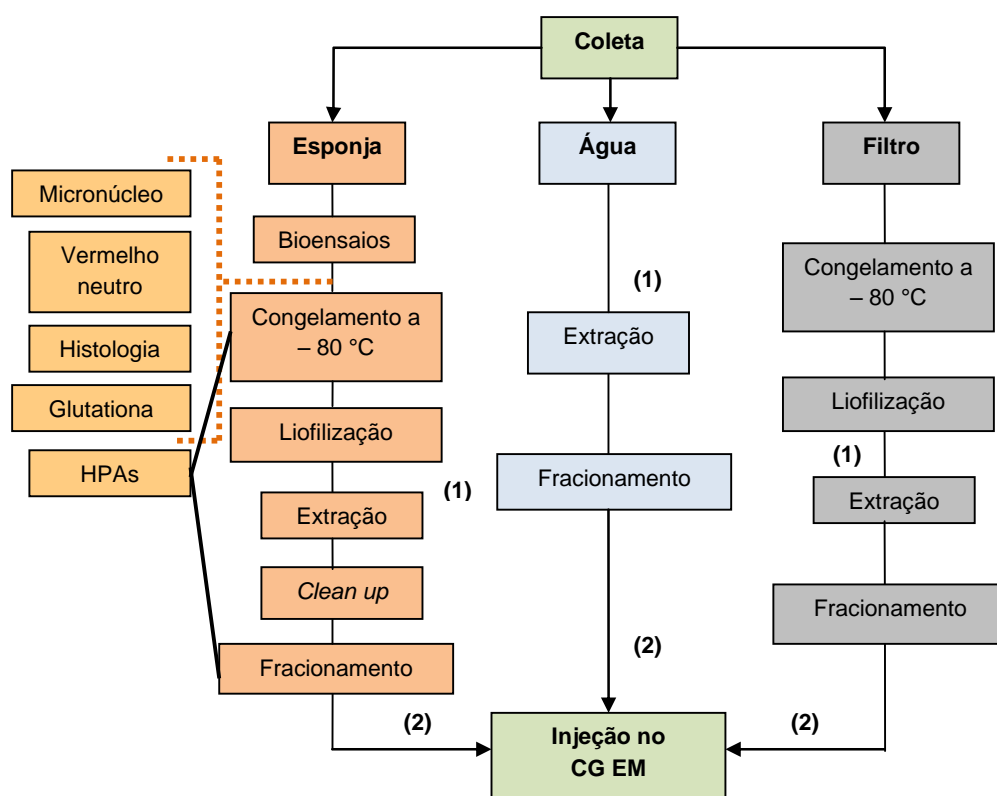


Figura 4.9 Etapas de tratamento das diferentes matrizes. (1) surrogate F2; (2) PI F2.

4.3.1.

Amostragem de água e parâmetros físico-químicos

A amostragem de água foi realizada nos mesmos pontos da coleta das esponjas, para avaliar o fator de acumulação (concentração do composto no organismo, dividida pela concentração do composto na água). Além disso, é importante a verificação das condições ambientais nas quais as esponjas estão expostas. A coleta de amostras de água foi feita conforme descrito no item 4.2.1 e a determinação dos hidrocarbonetos aromáticos por cromatografia em fase gasosa com detector de espectrometria de massas (CG EM) foi realizada segundo item 4.2.4.

4.3.1.1.

Parâmetros físico-químicos

A análise do oxigênio dissolvido foi realizada segundo o método desenvolvido por Winkler (1888). A amostragem de água em campo para análise do oxigênio dissolvido foi realizada com uma garrafa Van Dorn, transpondo a água coletada para frascos âmbar de volume aproximado de 125 mL, enchendo-os por completo até ocorrer o transbordamento, sempre evitando a formação de bolhas. A fixação foi feita com a adição de 1 mL de cloreto de manganês (MnCl_2) e 1 ml de iodeto alcalino ($\text{KI} + \text{KOH}$). Os frascos foram tampados e o excesso descartado. O oxigênio dissolvido foi controlado periodicamente nos aquários em laboratório. A titulação da amostra foi realizada, adicionando 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) na amostra para quebrar a reação entre os fixadores adicionados em campo. A solução foi homogeneizada, retirando o excesso. Em um erlenmeyer, colocou-se 50 mL da amostra e 1 mL de amido, como indicador, e titulou-se com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) até a solução ficar incolor. Anotou-se o volume titulado ao final da reação.

O nível de amônia foi estimado utilizando-se teste de aquário para água salgada da NUTRAFIN. A temperatura, pH e salinidade foram medidos em campo e controlados periodicamente nos aquários com o auxílio de termômetro, pHmetro e salinômetro, respectivamente.

4.3.2.

Amostragem e tratamento das amostras de filtro

Amostras de água foram coletadas para análise do material particulado em suspensão, segundo procedimento descrito no item 4.2.1, para avaliar o fator de acumulação através das partículas em suspensão. Uma vez no laboratório, as amostras foram filtradas com o auxílio do suporte para filtros de 142 mm da Millipore, até que o filtro atingisse a saturação e o volume foi aferido (Figura 4.10). Cada filtro representa uma amostra.



Figura 4.10 Sistema de filtração de água para material particulado. Foto: T. Pedrete.

Após a filtração das amostras de água, os filtros, contendo o material particulado, foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizados. Posteriormente, as amostras foram extraídas em Soxhlet com balão de 250 mL (Figura 4.3) por 24h com 200 mL de diclorometano. Uma alíquota de 50 μL surrogate de F2 (*p*-terfenil- d_{14} , $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionada previamente à extração. O volume foi reduzido no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences) e houve a troca de solvente para hexano.

O fracionamento dos compostos aromáticos e posterior quantificação seguiram os procedimentos descritos nos itens 4.2.3.3 e 4.2.3.4, respectivamente.

4.3.3.

Amostragem e preparação das amostras de *H. heliophila*

Esponjas (de aproximadamente 20g) foram coletadas com auxílio de faca, separadas por indivíduos e mantidas vivas em caixas térmicas contendo água do mar local. As esponjas foram mantidas em contato com água todo o tempo possível. Apenas na biometria, elas foram rapidamente retiradas do meio. No laboratório, para não causar estresse, somente organismos epifíticos foram retirados da superfície dos indivíduos. Apenas após os bioensaios, as esponjas foram eficientemente limpas, retirando-se a areia. Medidas morfométricas foram aferidas para avaliar possível perda de biomassa durante o experimento (Figura 4.11).

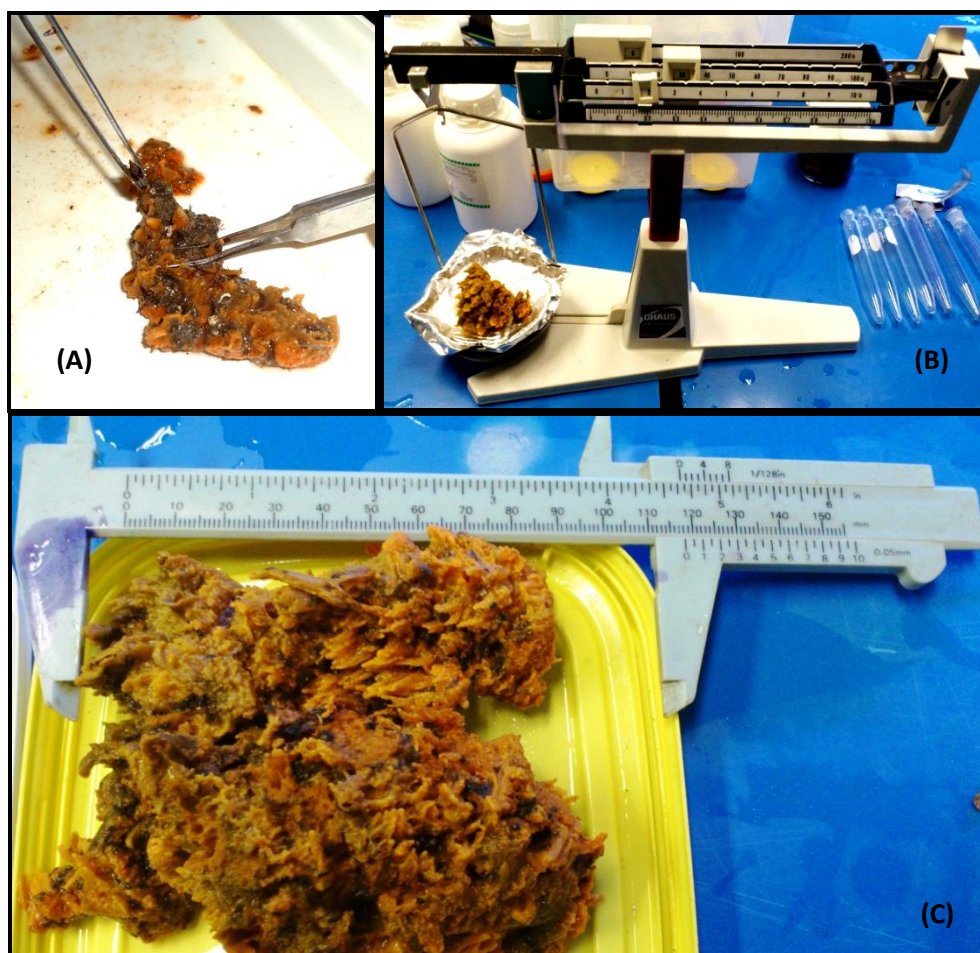


Figura 4.11 Limpeza (A) e medidas morfométricas (B) e (C) da esponja *H. heliophila*. Fotos: T. Pedrete.

4.3.4. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório Evolução e Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde (Universidade Federal do Rio de Janeiro), com a cooperação do Dr. Cristiano Coutinho.

Os aquários de 100 L foram preenchidos com 70 L de água artificial marinha preparada com dissolução do sal marinho artificial Coralife (microprocessado e de grau científico) em água destilada, e a oxigenação dos aquários foi mantida com bombas Sarlo Better 3000 L h⁻¹.

Durante os bioensaios, as esponjas foram mantidas sob temperatura de 21 °C ± 1 °C. Parâmetros físico-químicos, como pH, oxigênio dissolvido e amônia, foram monitorados ao longo dos bioensaios. As esponjas não foram alimentadas durante os bioensaios. As esponjas foram amarradas com linhas em tubos falcon para evitar a adesão destas ao vidro dos aquários e agitação destas pelo fluxo da bomba.

Partes das esponjas foram retiradas para análise histológica, ensaio do vermelho neutro e micronúcleo nos tempos estabelecidos em cada bioensaio. O restante dos espécimes da esponja *H. heliophila* foi congelado a - 80 °C e depois liofilizado (ModulyoD da Thermo), para posterior análise dos HPAs. A determinação destes compostos por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas realizou-se conforme o item 4.2.3.

4.3.4.1. Depuração

O bioensaio de depuração consiste em avaliar a capacidade do organismo de eliminar contaminantes presentes em seu interior, retirando o animal de um local sujo e colocando-o em um local limpo (*in situ*) ou em aquários com água limpa (*in vivo*). As esponjas foram coletadas na Urca, local considerado por estudos (Silva, 2010; Fontes, 2011) como relativamente poluído, com uso de esponjas como bioindicadoras. Foram coletadas 21 amostras de esponja, separadas em triplicata e 3 amostras de esponja, representando o tempo 0 h (T0), como amostra de campo, para

comparar a concentração inicial dos HPAs com as concentrações analisadas após cada período do bioensaio.

As esponjas foram distribuídas em triplicata nos 7 aquários, contendo água marinha artificial, de modo que cada aquário representasse um tempo de ensaio, como ilustrado na Figura 4.12. O experimento transcorreu por um período de 336 horas (h). Foram coletadas esponjas (N=3) a cada 24 h após o início do bioensaio até 96 h. Posteriormente, as amostras foram coletadas nos tempos (h) de: 168, 240 e 336 h. Porém, somente nos dois últimos tempos, não foi possível a realização de triplicata, devido ao tamanho pequeno das esponjas coletadas, sendo insuficiente para análise dos hidrocarbonetos aromáticos. O bioensaio foi repetido para comprovar tendência de depuração e comparar com o primeiro.

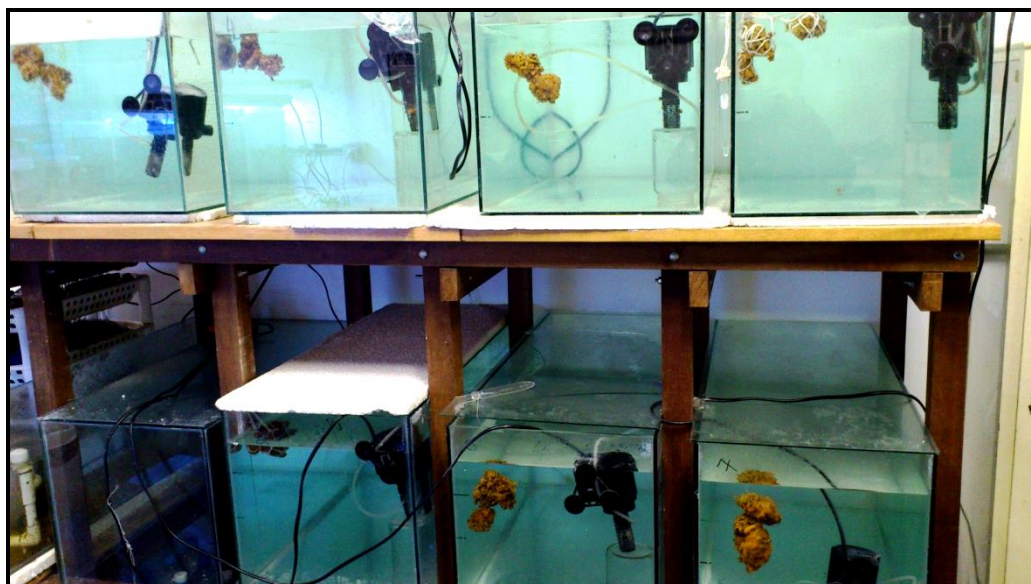


Figura 4.12 Esponjas distribuídas nos aquários. Foto: T. Pedrete.

4.3.4.2. Acumulação

O bioensaio de acumulação consiste na exposição do organismo a um determinado contaminante e sua consequente acumulação nos tecidos dos organismos. A estratégia do ensaio inclui inicialmente o uso de meio homeostático, em função da elevada taxa de filtração da esponja reportada na literatura, mantendo

um fluxo contínuo dos HPAs. Este procedimento não foi realizado, pois não foi possível monitorar a concentração do HPAs de maneira rápida e eficiente ao longo do experimento. A concentração na água deve ser conhecida e monitorada instantaneamente para aplicar fluxo contínuo e ter controle da concentração do HPA nos aquários.

As esponjas foram coletadas em Itaipu, no município de Niterói, por ser um local considerado por outro trabalho (Fontes, 2011) como área controle. No caso do bioensaio de acumulação, as esponjas devem provir de um local livre de contaminantes ou possuir uma contaminação mínima, para que estes organismos tenham uma acumulação significativa do composto de exposição.

Esponjas foram expostas ao hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), criseno, composto com potencial de carcinogenia. O padrão foi preparado em 10 mL de diclorometano, obtendo-se uma concentração de 56 mg mL^{-1} . A solução de trabalho foi preparada, diluindo-se 1 mL da solução padrão em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma concentração de $560 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, adicionou-se 5 mL desta solução em cada aquário, obtendo-se a concentração final de $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. O DMSO é um solvente utilizado como veículo na inoculação de xenobióticos nos animais (Eickhoff, 2003).

Durante o bioensaio, indivíduos de cada aquário foram recolhidos periodicamente (24, 48, 72 e 96 h), como mostra a Figura 4.13. O tempo 0 h foi representado por dois indivíduos como amostras de campo. O N amostral inferior ao outro bioensaio pode ser explicado por não haver muitos indivíduos na área de coleta, e pela dificuldade de coletar no dia devido à ocorrência de ondas sul-sudoeste, tornando o mar mais agitado. Não foi possível repetir o bioensaio para comprovar tendência de incorporação das esponjas e para aperfeiçoar a metodologia do ensaio, devido ao curto tempo para análise eficiente dos dados.



Figura 4.13 Ensaio de acumulação do criseno em esponjas. Foto: T. Pedrete.

Concomitantemente ao bioensaio, um teste foi realizado para verificar perda da concentração por volatilização e por outros processos físicos e químicos. Neste teste, criseno ($40 \mu\text{g.L}^{-1}$) em DMSO foi adicionado a um aquário, contendo 70 L de água marinha artificial, com as mesmas condições do bioensaio realizado com as esponjas. Porém, o teste foi feito sem estes organismos.

A concentração do criseno na água foi mensurada ao longo do teste e do bioensaio. Para isso, amostras de água foram coletadas em garrafas de 1 L para posterior análise de HPAs por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas, adotada no item 4.2.4. Para o teste, a diferença entre a concentração final e a inicial foi atribuída à perda do composto por volatilização e por outros processos físicos e químicos.

4.3.5.

Biomarcadores celulares e histológicos

4.3.5.1.

Extração celular

Os ensaios de micronúcleo e do vermelho neutro foram aplicados concomitantemente em todos os bioensaios descritos. As esponjas foram limpas em um recipiente contendo água do respectivo aquário. Posteriormente, estas foram picotadas em meio salino e lavadas novamente com este para que não tivessem resquício de água marinha (Figura 4.14).

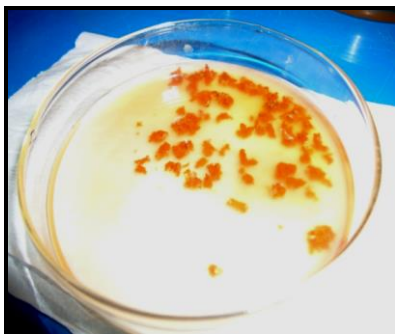


Figura 4.14 Corte da esponja em meio salino. Foto: T. Pedrete.

As células da esponja foram extraídas em um meio salino sem cálcio e magnésio, suplementada com um quelante (CMFSW-EDTA: *Calcium-Magnesium Free Sea Water with EDTA*), para enfraquecer as adesões celulares, seguindo protocolo descrito pelo LabCel (USP, 2009). Este meio foi preparado com 13,4 g de cloreto de sódio (NaCl 460 mM), 0,49 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄ 7 mM), 0,37 g de cloreto de potássio (KCl 10 mM), 1,19 g de Hepes (10 mM) e 0,47 de EDTA (2,5 mM) em 450 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado em torno de 8,0-8,2 com NaOH 1M. A solução final foi, então, avolumada para 500 mL.

Para tal, as esponjas foram colocadas em tubos siliconizados, contendo de 30 a 40 mL de CMFSW-EDTA, e estes foram deixados em rotação lenta por 30 min, em mesa agitadora Speci-Mix, da Thermolyne, para remover água do mar e cálcio residual dos fragmentos e facilitar dissociação posterior (Figura 4.15). Em seguida, a solução foi descartada e adicionou-se novamente a mesma quantidade colocada anteriormente CMFSW-EDTA e os tubos foram novamente deixados sob agitação por 60 min, tornando o líquido com aspecto turvo. Este foi filtrado em uma malha de nylon (50-100 µm), obtendo-se células para realizar ambos os testes.



Figura 4.15 Extração celular em meio salino. Foto: T. Pedrete.

4.3.5.2.

Ensaio do vermelho neutro

O ensaio do vermelho neutro (VN) foi realizado conforme método adaptado de Lowe *et al.* (1992). Para realizar o procedimento do vermelho neutro, a seringa foi preenchida com 100 µL de solução salina, previamente preparada, e suspensão celular (1:1), sendo as amostras rapidamente transferidas para tubos de Eppendorf siliconizados. A solução salina foi feita com 4,77 g Hepes (20 mM), 1,47 g CaCl₂ x 2H₂O (10 mM), 13,06 g MgSO₄ x 7H₂O (53 mM), 25,48 g NaCl (436 mM) e 0,75 g KCl (10 mM), diluindo em água destilada, avolumada a 1L em balão volumétrico. O pH foi ajustado para 7,36 com 1 M de NaOH.

O tubo foi cuidadosamente vertido para mistura. Cerca de 30 uL das células em suspensão (mistura hemolinfa/solução salina) foram transferidos para uma lâmina de microscópio limpa. As lâminas foram mantidas em uma câmara escura e úmida a 20° C (temperatura ambiente) por 15 min, permitindo adesão das células. Após 12 min, removeram-se as lâminas individualmente da câmara e o excesso de células em suspensão foi retirado, retornando as lâminas imediatamente para a câmara escura. Após este período, uma alíquota de 30 µL da solução de trabalho do vermelho neutro foi colocada sobre a camada de células. Esta solução foi preparada com 5 µL da solução estoque de VN (20 mg do vermelho neutro em 1 mL de DMSO) diluída em 995 µL de solução fisiológica. Após 15 min de incubação na câmara escura úmida, as lâminas foram examinadas sistematicamente em microscópio óptico Quimis Q708PL em aumento de x10, primeiramente, e depois em aumento de x40. Após mais 15 min de incubação, as lâminas foram examinadas novamente em intervalos de 30 min para determinação do tempo em que há evidência da perda do corante dos lisossomos para o citosol. O teste de cada lâmina determina quando há perda evidente de 50 % do corante dos hemócitos granulares. O tempo de retenção (*Neutral Red Retention Time*) foi então calculado para cada amostra.

4.3.5.3. Ensaio do micronúcleo

O procedimento do micronúcleo (MN) (Figura 4.17) foi realizado em duplicata para cada indivíduo, utilizando o método de Nudi *et al.* (2010). Aliquotas de 50 μ L de células foram transferidas para lâminas, previamente tratadas com solução de adesão celular (água destilada:Poli-L-Lisina 1:10, v/v), espalhando-as cuidadosamente com ajuda da ponteira da micropipeta. Em seguida, as lâminas foram depositadas em uma câmara úmida, por aproximadamente 30 min para que as células aderissem às lâminas. Após secagem das lâminas aor ar livre, estas foram fixadas com solução Carnoy (metanol:ácido acético 3:1, v/v) por 20 min, e novamente colocadas para secar. As lâminas, então, foram coradas com solução Giemsa (corante diluído em tampão) a 3 % por 20 min e lavas com água destilada. Depois de secas, lâminas foram cobertas com lamínulas com Entellan[®] e foram examinadas em microscópio óptico Quimis Q708PL, através da contagem de 1000 células por lâmina com aumento de 40x. A porcentagem de MN foi calculada através da equação 4.4.

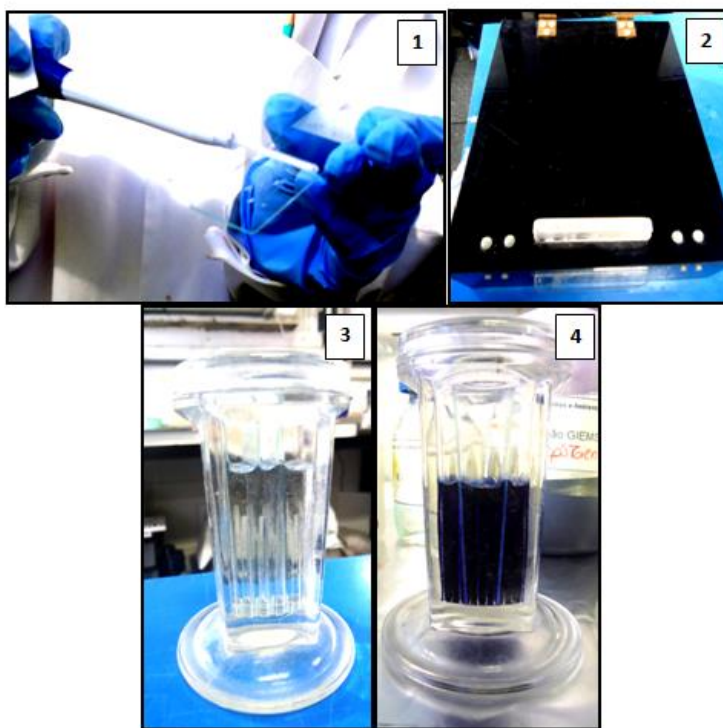


Figura 4.16 Etapas do ensaio do micronúcleo: 1 - Espalhamento da suspensão celular na lâmina; 2 - Câmara úmida; 3 - Fixação; 4 - Coloração. Fotos: T. Pedrete.

$$MN\% = \frac{\text{número de células contendo micronúcleo}}{\text{número total de células contadas}} \times 100 \quad (4.4)$$

4.3.5.4. Glutathiona

A análise da glutathiona reduzida foi realizada no Laboratório de Bioanalítica (PUC-Rio), em colaboração com a Dra. Rachel Ann Hauser-Davis.

A extração da proteína GSH foi realizada através da técnica de Beutler (1963), com modificações por Wilhelm-Filho (2005), usando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB). As amostras (200 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M e colocadas em Eppendorf. Posteriormente, estas foram centrifugadas a 13.500 rpm por 30 minutos a 4 °C, para precipitar as proteínas, transferindo cuidadosamente o sobrenadante para outros microtubos. Ao sobrenadante (75 µL) foram adicionados 150 µL de DTNB 0,25 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 e 75 µL de água Milli-Q.

Após o procedimento de preparo das amostras e da curva analítica, alíquotas foram colocadas na microplaca para incubação por 15 minutos, previamente a leitura das amostras. A formação do ânion tiolato, que resulta da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Hamilton 190 SpectraMax) a $\lambda = 412$ nm. O conteúdo de GSH foi expresso em nmol g⁻¹ proteína⁻¹. A concentração de GSH é estimada, utilizando uma curva analítica (Tab 4.3) plotada com GSH (glutathiona reduzida) como padrão externo. Para tal, foi necessário o preparo de solução estoque de GSH 10 mM. Os pontos da curva analítica (em µM) foram: 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 500, 750 e 1000, avolumando a solução com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0. A cada ponto da curva analítica (75 µL) foram adicionados 150 µL DTNB em tampão, descrito anteriormente, e 75 µL de água Milli-Q.

4.3.5.5. Histologia

A quantificação relativa de cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) foi realizada a partir do método de observação de cortes histológicos corados por Hematoxilina/Eosina (HE), adequados para evidenciar características estruturais. Enquanto a análise estereológica das fibras colágenas foi obtida pela visualização de cortes histológicos corados através da técnica histoquímica de Picrosírius, que é específica para colágeno.

Para ambas as técnicas, uma parte da esponja foi retirada, de maneira com que o corte apresentasse a base até o ápice. Tal parte da esponja foi colocada em 40 mL de solução fixadora de Bouin por 6 h e lavado com etanol 70 % repetidamente por 30 min cada para que a cor amarelada, indicativa da presença do fixador, não fosse mais observada. A fixação paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para os tratamentos posteriores. Este processo consiste basicamente na estabilização da estrutura das proteínas, por coagulação. O processo de fixação procura preservar a estrutura celular, sem alterar a química da célula. Após a fixação, três etapas de preparo das amostras foram realizadas: emblocamento, corte e coloração, de acordo com métodos padrão de histologia, modificados de Behmer *et al.* (1976):

- Emblocamento:

Para o emblocar com parafina, a amostra da esponja fixada foi colocada em cassetes, previamente lavados e identificados. O processo de desidratação remove a água dos tecidos fixados e endurecidos, para que a parafina possa penetrar no tecido, tornando o material resistente ao corte por micrótomo. Para desidratar o fragmento, empregou-se uma série etanólica, na qual o material passou sucessivamente por soluções de etanol (70, 100 e 100 %), por 30 min cada. Quando a matriz escolhida é insolúvel em etanol, este deve ser substituído gradualmente por um solvente, no qual a mesma seja solúvel, para que possa penetrar no interior do tecido. No caso da matriz ser parafina, após desidratação, o material foi submetido a dois banhos de 30 min cada em xilol puro, tornando-o apto a receber a matriz. Os cassetes, contendo o material a ser analisado, foram então, imersos em dois banhos de parafina fundida por

30 min cada, preenchendo-os de modo a formar um pequeno bloco, que posteriormente foi retirado do molde.

- Corte:

O bloco devidamente aparado foi colocado sobre suporte, fixado no micrótomo RM 21-55 (Leica, Alemanha) e seccionado. Cortes com tamanho de 7 μm realizados foram um pouco mais grossos que o normal, devido ao tecido esponjoso. A fita formada com os cortes foi esticada em superfície de água quente até distensão dos cortes, quando estes ficam translúcidos. Os cortes foram, então, colocados na lâmina e levados à estufa a 20 °C por 48 h para secar. Dos diversos cortes realizados, foram selecionados quatro cortes por lâmina para HE e três para picrossírius.

- Coloração:

Como os corantes são hidrofílicos, as lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por 30 min, para derretimento da parafina. O excesso desta matriz foi retirado com imersão em xilol. Em seguida o xilol foi substituído por água, através de banhos sucessivos de álcool de concentração decrescente 100, 100, 70 % e água, durante 30 min cada. Para coloração por hematoxilina e eosina (HE), as lâminas foram colocadas em solução de hematoxilina de Harris por 10 min e lavadas com água destilada. Posteriormente, foram imersas em solução de eosina por 1 min e lavadas novamente com água destilada acética. Para coloração das fibras de colágeno por picrossírius, foi utilizado o método modificado, descrito por Dolber & Spach (1993). As lâminas foram colocadas por dois minutos em uma solução de ácido fosfomolibdico e, em seguida, na solução de picrossírius por 90 min, abrigadas da luz. Posteriormente, as lâminas foram imersas em ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ por 1 min e, em seguida, em álcool 70% por 45 s.

Após a coloração, a resina Entellan foi usada pra fixar a lamínula na lâmina. O corte teve que ser desidratado novamente para receber a resina. Para isto, as lâminas foram banhadas em uma nova série etanólica ascendente (70, 100, 100%) e em xilol puro por três vezes por 5 min cada, para os cortes ficarem transparentes.

Os cortes histológicos corados por HE foram serialmente fotografados e uma imagem completa foi digitalmente montada. No total, cerca de 100 fotos por corte foram tratadas. A área do corte foi selecionada e a quantidade relativa de cavidades

(canais aquíferos e câmaras coanocitárias) foi estimada. O microscópio óptico de campo claro AxioPlan (Zeiss, Alemanha) com objetiva de 10x e ocular de 20x, a câmara fotográfica AxioCam MRm (Zeiss, Alemanha) e o programa AxioVision foram utilizados para obter as imagens. As fotos foram juntadas, formando o corte inteiro. Para isso, foi necessário utilizar o photoshop Adobe Photoshop CS 5.1 e as imagens foram tratadas no programa ImageJ, no qual somente as áreas selecionadas foram analisadas e os espaços vazios contabilizados dentro destas.

A quantificação do colágeno é baseada na intensidade da coloração, mas a cor tem que se destacar do background para ser computada. Se o colágeno for fabricado, mas ficar disperso, o background será alto e o valor será baixo. Valor alto representa colágeno organizadamente concentrado em pontos específicos. A avaliação do colágeno no tecido foi feita com o microscópio de fluorescência ApoTome (Zeiss, Alemanha) em comprimento de onda referente à rodamina (cor vermelha, filtro Schott-Zeiss, Alemanha). Foram capturadas 20 fotos por corte, totalizando 60 fotos. O processamento e tratamento das fotos foram feitas pelo programa ImageJ e depois foi calculada a média das 60 fotos.

4.4.

Tratamento estatístico

Técnicas avançadas de estatística não foram usadas devido à característica mais descritiva do conjunto de dados. Matrizes e gráficos com nível de 95% de confiança foram realizados para verificar nível de correlação, como a relação entre os biomarcadores e a concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no tecido. Gráficos de regressão linear ($p < 0,05$) foram empregados para avaliar a distribuição relativa dos HPAs leves e pesados. O cálculo não-paramétrico, de Wilcoxon-Mann-Whitney, foi realizado para avaliar significativamente ($p < 0,05$) a diferença entre amostras agrupadas por tempo no ensaio de depuração. O teste de Spearman foi empregado para avaliar a correlação entre o tempo de retenção do vermelho neutro e a acumulação do criseno e a relação entre as análises histológicas e os tempos de duração de cada bioensaio. As análises estatísticas foram realizadas no Programa STATISTICA 6.0 da StatSoft®.

5 Resultados e Discussão

5.1. Biomonitoramento passivo com a esponja *Hymeniacidon heliophila*

5.1.1. Análise de HPAs em amostras de água da Baía de Guanabara

A concentração dos 16 HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPAs}$) e dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$) foi de 0,78 ng L⁻¹ para ambos em Itaipu, 10,2 ng L⁻¹ e 17 ng L⁻¹ na Praça XV e 56,3 ng L⁻¹ e 105,1 ng L⁻¹ na Urca. Os resultados para os compostos individuais nos três locais de coleta estão reportados no Anexo I.

Comparando os valores encontrados aqui com concentrações anteriormente reportadas para o mesmo ambiente, assim como ambientes similares no mundo, nota-se que os mesmos são inferiores à maioria dos estudos (Tab 5.1). Vale ressaltar que os dados de HPAs do PDBG (2000) são posteriores ao derrame do óleo MF380 em 18 de janeiro de 2000 (aproximadamente 1280 m³). Pode-se observar que houve uma diminuição nos valores das concentrações de HPAs nos trabalhos realizados nos últimos 15 anos, o que pode ser interpretado como uma melhora na qualidade da água na Baía de Guanabara. No entanto, as concentrações de contaminantes nas águas são muito variáveis no tempo e espaço, logo, não é possível afirmar que as águas da Baía de Guanabara encontram-se menos poluídas atualmente. As estações de coleta do presente estudo se situam na porção da baía onde ocorre uma maior renovação de suas águas, diferentemente dos pontos escolhidos pelos outros autores. Fatores como proximidade da fonte poluidora, tipo de fonte e da estação do ano podem influenciar na concentração de HPAs na água do mar (Bihari *et al.*, 2007).

Tabela 0.1 Concentrações de HPAs em água em outros estudos.

Localização	Data	Nº HPAs	Faixa (ng L ⁻¹)	Referência
Baía de Guanabara	NOV 95	38	930 - 2970	Hamacher (1996)
Baía de Guanabara	AGO	38	120 - 1750	Azevedo (1998)
	DEZ 96	38	290 - 1480	
Baía de Daya, China	AGO 99	16	4228 – 29325	Zhou & Maskaoui (2003)
Baía de Guanabara	JAN 00	16	76 – 328	PDBG (2000)
		32	11185-5446	
Baía de S. Francisco, USA	93 a 01	25	5 - 47	Oros <i>et al.</i> (2007)
Baía de Guanabara (Portos)	SET/OUT	16	0,9 – 10,4	Pedrete (2010)
	10	38	1,5-20,4	
Baía de Guanabara (Praça XV/ Urca)	FEV 11	16	10,2*/56,3*	Este estudo
		38	16,9*/105,1*	
Itaipu	MAR 11	16	0,780*	Este estudo

*Amostra única

As amostras de água da Baía de Guanabara e de Itaipu apresentaram influência pirogênica devido à presença de HPAs não-metilados (parentais) em maior concentração quando comparados aos HPAs metilados (alquilados) e devido à maior abundância relativa de compostos com maior número de anéis aromáticos. Esta característica também foi apresentada pelas amostras de Itaipu. Soma-se a isto a variação na distribuição dos HPAs leves e pesados nas amostras. Todas essas apresentaram pouca abundância de HPAs leves, com 2 a 3 anéis aromáticos, havendo uma maior dominância de HPAs pesados, contendo 4 a 6 anéis, podendo-se inferir como de origem pirogênica. Segundo Neff (1979), compostos de 4 a 6 anéis aromáticos tendem a predominar no processo de combustão e os compostos alquilados são os de menor contribuição.

Fontes (2011) analisou a concentração de HPAs em água da Baía de Guanabara e de Itaipu e encontrou valores maiores que nas amostras do presente estudo. Em Itaipu, as concentrações foram as mais significativas (1100 ng L⁻¹ para HPAs totais) e obteve amostras com maior proporção de HPAs compostos por 4 a 6 anéis, caracterizando o local com indícios de fonte pirogênica. As amostras coletadas na Urca (500 ng L⁻¹ para HPAs totais) apresentaram influência de fonte

petrogênica, pois ali dominaram os HPAs de baixo peso molecular e grande quantidade relativa de HPAs alquilados.

A Figura 5.1 ilustra a distribuição de HPAs leves (2-3 anéis) e pesados (4-6 anéis) nas amostras de água coletadas em Itaipu, Praça XV e Urca. O somatório, tanto dos leves, quanto dos pesados, quando inclui apenas os 16 HPAs e exclui os alquilados, o perileno e os dibenzotiofenos, compostos presentes no petróleo, a contribuição de HPAs revela uma maior contribuição pirogênica, ou seja, de uma maior abundância dos HPAs de alto peso molecular (4 a 6 anéis). Esta contribuição na Praça XV pode ser devida ao despejo de efluentes e ao tráfego de veículos próximo ao local. Após ser realizada esta mesma divisão entre leves e pesados, considerando os HPAs totais, pode ser verificada que na amostra de Itaipu, não há presença de alquilados e o crescimento de até 30% dos compostos leves nas demais estações ocorreu pela inclusão dos alquilados e dos dibenzotiofenos, que possuem origem petrogênica, o que pode indicar uma mistura de fontes. O perfil dos dibenzotiofenos, por exemplo, é típico de óleo degradado. Séries alquiladas de dibenzotiofeno indicam uma típica degradação de óleo caracterizada com a distribuição $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$ (Wang *et al.*, 1999).

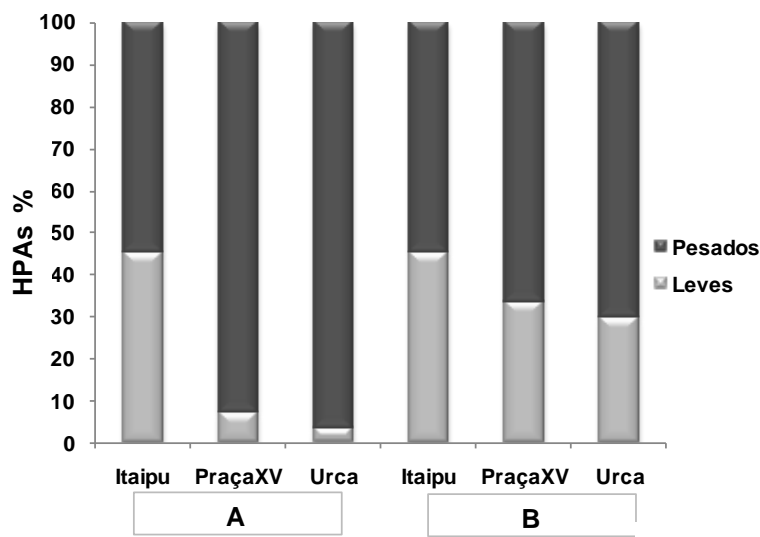


Figura 5.1 Distribuição de HPAs e leves e pesados nos locais de amostragem de água. A – 16 HPAs; B- 38 HPAs.

Segundo a Resolução CONAMA (Nº 357/2005), o limites máximo reportados para alguns compostos em água, como criseno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno e

indeno(1,2,3-cd)pireno, é de 18 ng L^{-1} . A Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US EPA) define para o benzo(a)pireno um limite de concentração 10 vezes superior ao da regulamentação brasileira (200 ng L^{-1}). Neste estudo, todos os valores obtidos para estes compostos estiveram abaixo do limite máximo legal.

5.1.2.

Teor de lipídios e análise de HPAs em esponja

O teor de lipídio variou entre 1,72 e 3,70 %, 2,76 a 4,28 %, 2,31 a 3,64 % nas esponjas de Itaipu, Praça XV e Urca, respectivamente, como mostrado na Tabela 5.2. Houve correlação estatisticamente significativa entre o teor de lipídios e a concentração dos HPAs no tecido das esponjas apenas para as amostras coletadas em Itaipu ($r = 0,73$ a $p < 0,05$), como é ilustrada na Figura 5.2. Os processos de acumulação, biotransformação e eliminação dependem de fatores como as propriedades físico-químicas do contaminante, a capacidade do sistema enzimático de metabolizar o composto e do teor de lipídios do animal (Newman *et al.*, 2002). A correlação entre a concentração de HPAs no tecido de esponjas e o teor de lipídios pode ser que não seja aleatória, já que o teor pode influenciar na acumulação destes compostos e a ausência da correlação em esponjas nos demais locais estudados pode ser devido a fatores intrínsecos e extrínsecos.

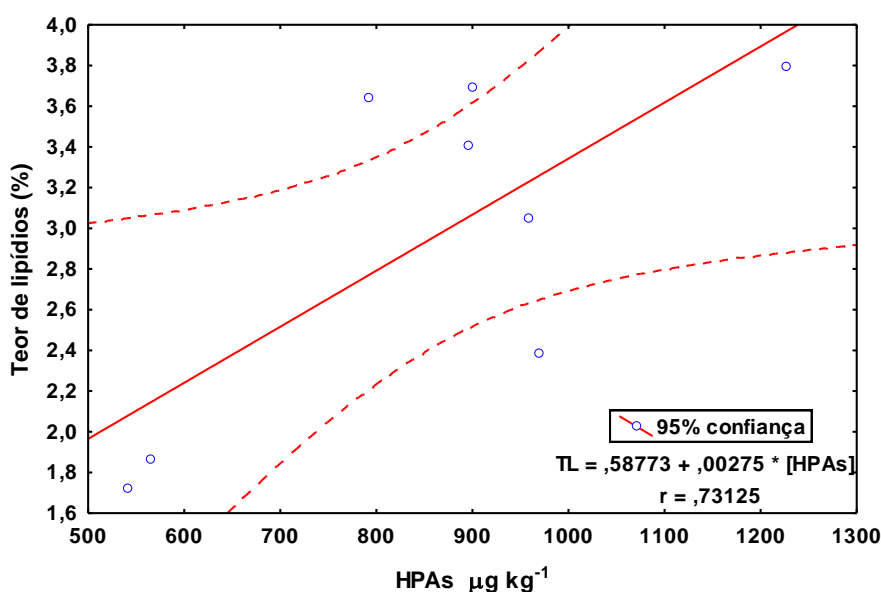


Figura 5.2 Correlação entre teor de lipídios e concentração dos HPAs em Itaipu.

Tabela 0.2 Teor de lipídios das amostras de tecido de *Hymeniacidon heliophila*.

Local	Indivíduo	Teor lipídio (%)	Local	Indivíduo	Teor lipídio (%)	Local	Indivíduo	Teor lipídio (%)
Itaipu	1	1.72	Praça XV	1	3.45	Urca	1	3.31
	2	3.64		2	3.78		2	2.31
	3	2.38		3	4.28		3	3.16
	4	1.86		4	3.74		4	3.64
	5	3.41		5	2.76		5	3.32
	6	3.79		6	3.82		6	3.35
	7	3.05		7	3.69		7	2.40
	8	3.70		8	3.04		8	3.36
							9	3.44
							10	2.84

A média das concentrações das amostras de tecido da esponja *Hymeniacidon heliophila* dos 16 HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPAs}$) e dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$) foi de $126,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $855,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ em Itaipu, $874,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2639,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ na Praça XV, $286,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2065,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ na Urca. Os níveis de HPAs individuais, nos três locais de amostragem, estão reportados nos Anexos II, III e IV, respectivamente.

Comparando os valores encontrados no presente estudo com concentrações obtidas para o mesmo ambiente, assim como em ambientes similares no mundo, verifica-se que são superiores àquelas da maioria dos trabalhos (Tabela 5.3).

Tabela 0.3 Concentrações de HPAs em tecido de *Hymeniacidon heliophila* e outras espécies de esponjas em diversos estudos.

Localização	Data	Nº HPAs	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
Guam (portos)	05	16	46-722	Denton <i>et al.</i> (2006)
Itaipu	JUN 10	15*	135,36	Fontes (2011)
		38	254, 51	
Baía de Guanabara (Urca/Praça XV)	JUL 10	15*/38	339, 67 / 2267,08	Fontes (2011)
		15*/38	859,51 / 2453,44	
Baía de Guanabara (Praça XV/Urca)	FEV 11	16/38	874,9 / 2639,2	Este estudo
		16/38	286,9 / 2065,95	
Itaipu	ABR 11	16	126	Este estudo
		38	855,8	

*O fluoreno não foi detectado.

Fontes (2011) avaliou a concentração dos HPAs no tecido da esponja *Hymeniacidon heliophila*, coletadas durante o inverno de 2010 e encontrou maiores valores na estação Praça XV com média de 2453,44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os HPAs totais. Os menores valores foram das amostras coletadas em Itaipu, com 254, 51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório dos HPA totais. Quando comparados aos níveis dos HPAs realizados no presente estudo, nas amostras do biomonitoramento passivo, as concentrações foram altas na Praça XV e foram baixas na Urca. Em relação às amostras de Itaipu, os níveis reduziram para os 16 HPAs e os dos totais cresceram significativamente.

As amostras de tecido em Itaipu e na Urca apresentaram maior abundância de HPAs leves, podendo-se dizer que há influência petrogênica nestes dois locais, ao contrário das esponjas da Praça XV, que apresentaram um perfil pirogênico. Nas amostras coletadas por Fontes (2011), as esponjas da Praça XV e de Itaipu mostraram um caráter de contaminação pirogênica, enquanto as esponjas da Urca apresentaram um perfil petrogênico. Uma possível explicação para que as amostras coletadas em Itaipu, do presente estudo, tenham um perfil petrogênico é a transitoriedade da qualidade da água, ou seja, a composição pode mudar rapidamente em função das condições ambientais e da presença de fontes descontínuas, além do tráfego de pequenas embarcações pesqueiras, que chegam à praia na parte da manhã, quando a coleta foi realizada em maré baixa. A combinação destes fatores deve ter colaborado para a verificação de compostos leves e alquilados nas esponjas.

A Figura 5.3 ilustra a distribuição de HPAs leves (2-3 anéis) e pesados (4-6 anéis) nas amostras de esponja coletadas em Itaipu, Praça XV e Urca. A grande maioria dos trabalhos publicados se restringe ao no máximo determinar os 16 compostos parentais. Com o somatório de apenas estes HPAs, as amostras apresentaram uma maior contribuição pirogênica, devido à maior abundância dos compostos pesados. Com o somatório de HPAs totais, pode ser verificado que houve um crescimento de até 70 % na soma dos HPAs leves, que foi ocasionado pela inclusão dos alquilados e dos dibenzotiofenos, os quais possuem origem petrogênica, o que pode indicar mistura de fontes em Itaipu e na Urca. As amostras da Praça XV continuam com características de processo de combustão.

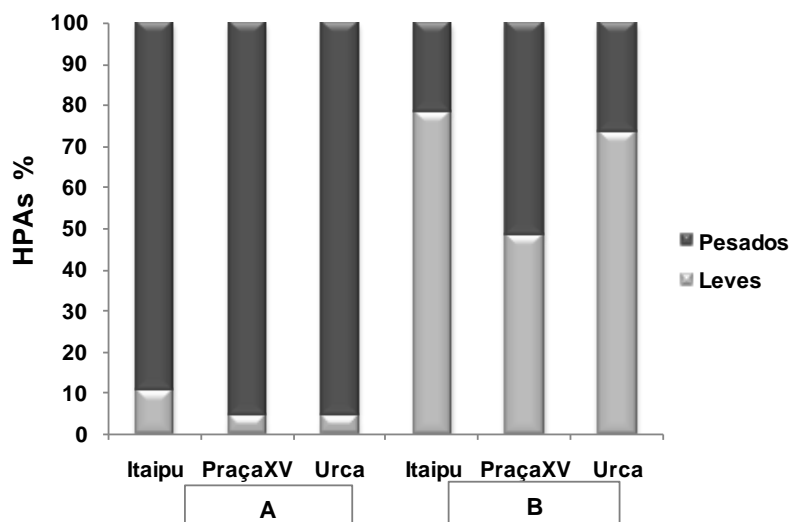


Figura 5.3 Distribuição de HPA's e leves e pesados nos locais de amostragem de esponja para o biomonitoramento passivo e ativo. (A) 16 HPA's; (B) 38 HPA's.

Denton *et al.* (2006) analisaram níveis de HPA's em diversas esponjas nos portos de Guam. As esponjas *Dysidea sp.* e *Stylotella aurantium* apresentaram maiores valores do somatório dos HPA's prioritários, com grande contribuição dos HPA's de alto peso molecular, sugerindo assim, a origem pirogênica dos HPA's nas esponjas. A maior incorporação dos HPA's pesados pelas esponjas da Urca, da Praça XV e algumas de Itaipu, possivelmente, acontece devido à adsorção destes compostos em partículas suspensas, que posteriormente, podem ser sedimentadas ou incorporadas através da filtração por organismos marinhos. As esponjas filtram estas partículas e, logo, assimilam aqueles compostos que estão adsorvidos. As razões pelas quais os HPA's pesados sofrem o processo de adsorção são a baixa volatilidade e alta lipofilicidade, que fazem com que estes sejam rapidamente adsorvidos ou depositados no sedimento (Neff, 1979).

O gráfico de regressão foi realizado para identificar a distribuição relativa dos HPA's leves e pesados nas amostras de água e de tecido de esponja. As amostras apresentaram uma fonte comum, com tendências diferentes entre leves e pesados (Figura 5.4). A correlação foi significativa ($p < 0,05$).

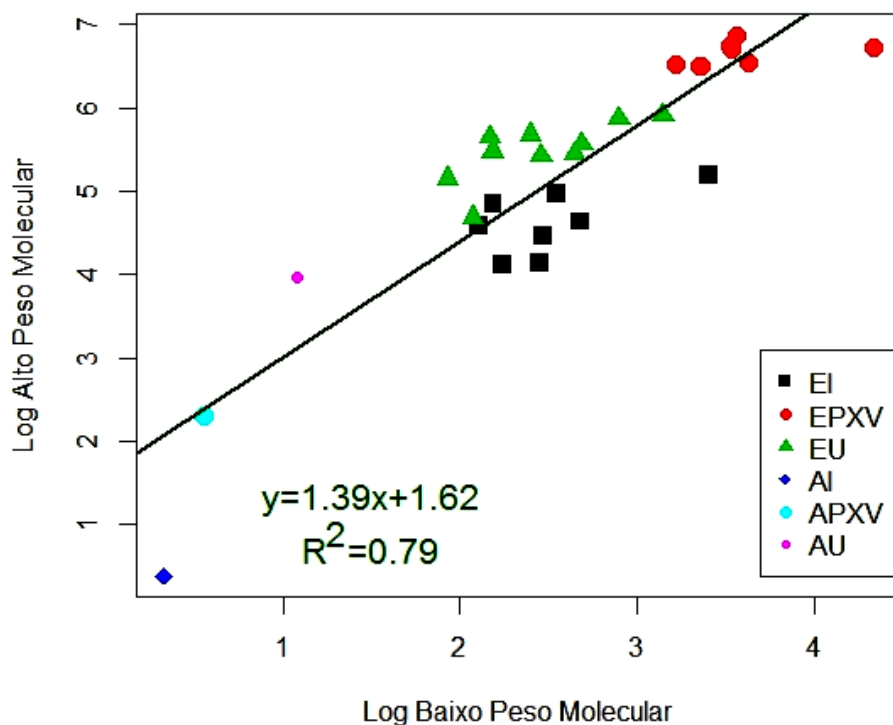


Figura 5.4 Log-log plot da soma dos HPAs de alto e baixo peso molecular. EI – esponja Itaipu; EPXV – esponja Praça XV; EU – esponja Urca; AI – água Itaipu; APXV – água Praça XV; AU – água Urca.

A Figura 5.5 mostra a diferença entre as tipologias dos HPAs presentes no tecido da esponja *H. heliophila* nas três estações de coleta. Nas amostras de Itaipu ocorreram as maiores concentrações dos HPAs leves; naquelas oriundas da Praça XV, compostos pesados e alquilados tiveram maior contribuição, e nas amostras da Urca predominaram compostos leves e alquilados. Todas as amostras mostraram alta proporção relativa de compostos alquilados, com a abundância crescente na seguinte ordem: Praça XV < Itaipu < Urca. Um maior grau de alquilação usualmente pode caracterizar uma origem petrogênica, pois durante a formação do petróleo há formação mais abundante de HPAs alquilados. O processo de degradação pode alterar a assinatura original da fonte e assim pode afetar a avaliação desta.

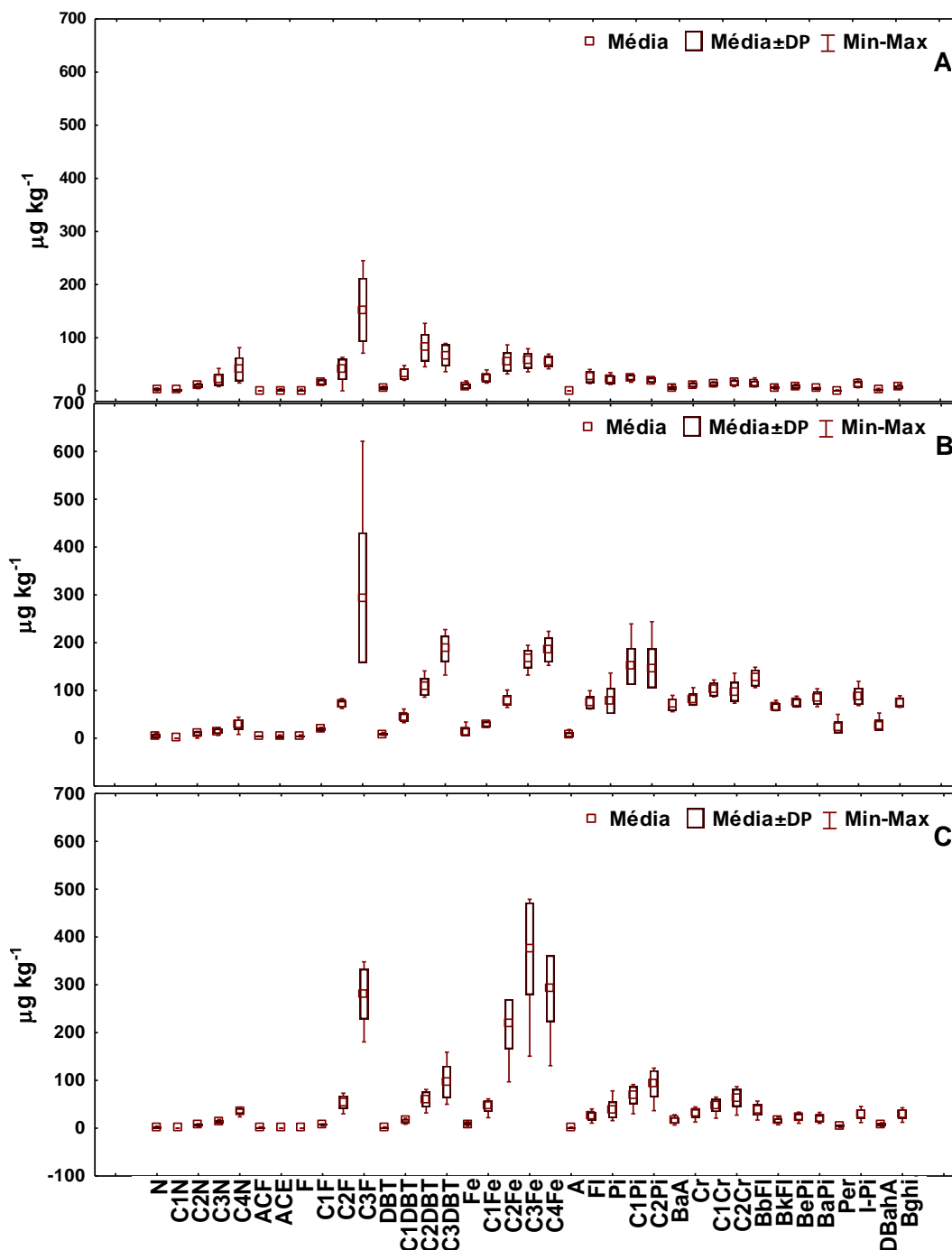


Figura 5.5 Variação na tipologia dos HPAs em esponjas coletadas em Itaipu (A), Praça XV (B) e Urca (C) para o biomonitoramento passivo.

Grande parte das amostras de Itaipu e as amostras da Praça XV apresentaram distribuição $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$ dos alquilados de naftaleno, dibenzotiofeno e fenantreno, indicando óleo degradado. As demais amostras de Itaipu mostraram esta característica e mais a distribuição dos homólogos

alquilados do fenantreno em formato de sino, que segundo Wang *et al.* (1999), é característico de óleo recente. Uma possível explicação para essas distribuições numa mesma amostra é a indicação de fonte natural para as séries de alquilados. A contribuição relativa do perileno nestas amostras evidencia a entrada de hidrocarbonetos naturais. Este composto é encontrado associado com a matéria orgânica continental e com condições redox (Wakeham, 1977). Enquanto as amostras da Urca foram caracterizadas com os dois tipos de óleo, tanto degradado, quanto óleo recente com a distribuição dos alquilados de fenantreno em formato de sino. Este fato pode ser interpretado como consequência de diversos tipos de entrada de HPAs combinados.

5.2.

Biomonitoramento ativo com a esponja *Hymeniacidon heliophila*

5.2.1.

Depuração

5.2.1.1.

Concentração de HPAs em amostras de água e filtro

A média das concentrações dos 16 HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPAs}$) e dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$) nas amostras de água e de filtro de campo (T0) foi de 72,8 ng L⁻¹ e 103,7 ng L⁻¹ e 108,7 ng L⁻¹ e 300,1 ng L⁻¹, respectivamente. Os resultados para os compostos individuais estão reportados no Anexo V.

Verificaram-se indicativos da procedência e o perfil dos HPAs nas amostras de água e filtro para avaliar as características de exposição das esponjas no ambiente (Figura 5.6). As amostras de água da Urca apresentaram uma tipologia de HPAs que sugere influência pirogênica devido à menor abundância de HPAs alquilados. Além disso, as amostras possuem maior influência de compostos pesados, contendo 4 a 6 anéis, tipicamente de origem pirogênica. Enquanto as amostras de filtro mostraram distribuição $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$ dos alquilados de fluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno e criseno, indicando óleo degradado.

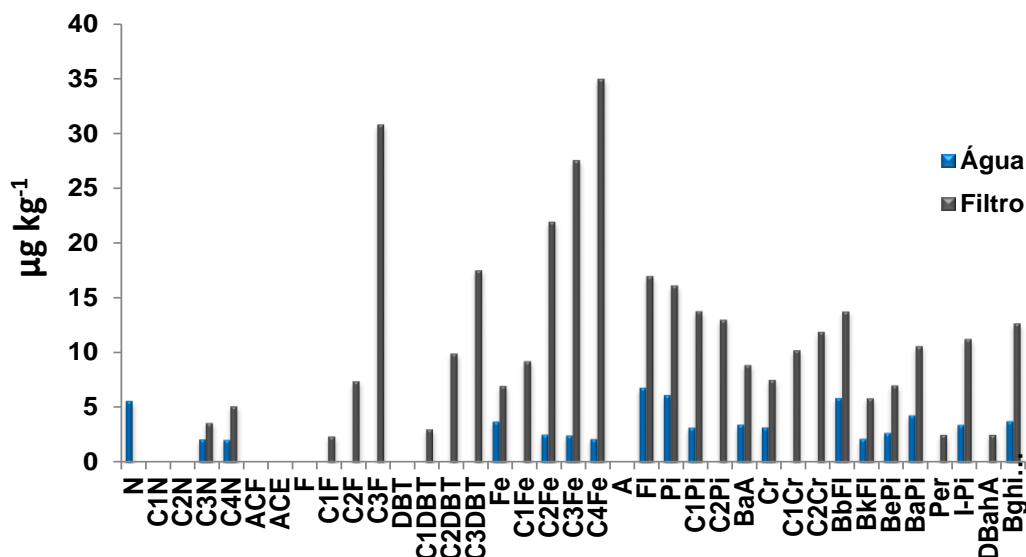


Figura 5.6 Tipologia dos HPAs em amostras de campo de água e filtro.

As amostras de filtro apresentaram em média 94 % dos 16 HPAs na forma de compostos pesados. Esta alta contribuição demonstra a tendência dos HPAs pesados adsorverem em partículas, devido à alta lipofilicidade. (Gschwend & Schwarzenbach, 1992). Entretanto, no caso do material particulado encontrou-se também uma alta proporção de alquilados, principalmente dos HPAs leves que atingiram até 61% dos alquilados. Em relação aos HPAs totais, os alquilados de menor massa molecular alcançaram até 51%, o que caracteriza a presença também de material de origem petrogênica nas amostras. Somente com a quantificação dos HPAs alquilados, foi possível verificar a presença de componente petrogênico nessas amostras.

5.2.1.2.

Teor de lipídios e concentração de HPAs em esponja

A Tabela 5.4 mostra a variação do teor de lipídios em uma faixa de 1,69 a 4,79 % nas esponjas de campo (T0) e aquelas analisadas durante o bioensaio. Neste estudo, a correlação entre os teores de lipídios e concentração de HPAs nos tecidos foi estatisticamente significativa ($r=0,49$, $p<0,05$) (Figura 5.7). A redução de lipídios pode ser visualizada na Figura 5.8, que a partir do tempo de 96 h, corresponde ao decréscimo da concentração de HPAs no tecido de esponjas. Por se tratar de indivíduos diferentes, a variação do teor de lipídios nas primeiras 48 h

é aceitável, pois é pouco provável obter a mesma resposta para todos os indivíduos. Como explicado no item 5.1.2, os processos de acumulação e eliminação dependem do teor de lipídios, ou seja, esta relação pode não ter ocorrido aleatoriamente, segundo dados de correlação encontrados.

Tabela 0.4 Teor de lipídios em esponjas do bioensaio de depuração.

Bioensaio	Indivíduo	Teor de lipídio (%)
<i>Depuração</i>	T0 - R1	1,80
	T0 - R2	2,75
	T0 - R3	2,51
	T24 - R1	4,79
	T24 - R2	3,25
	T24 - R3	1,79
	T48 - R1	2,21
	T48 - R2	2,42
	T48 - R3	1,69
	T72 - R1	2,93
	T72 - R2	2,84
	T72 - R3	3,37
	T96 - R1	3,03
	T96 - R2	2,57
	T96 - R3	2,73
	T168 - R1	2,76
	T168 - R2	2,75
	T168 - R3	2,25
	T240 - R1	1,81
	T240 - R2	2,99
	T336 - R1	1,88
	T336 - R2	2,34

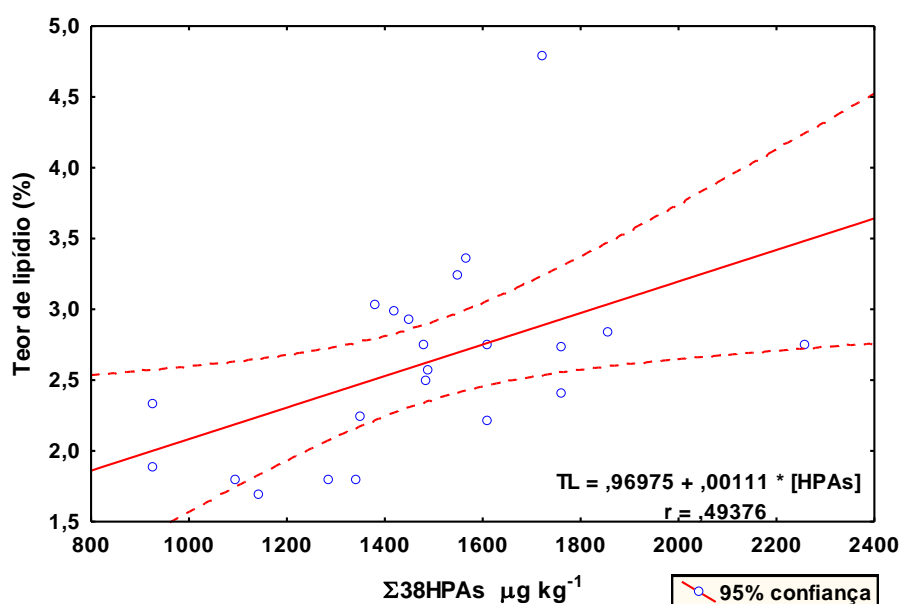


Figura 5.7 Correlação entre teor de lipídios e concentração dos HPAs no tecido.

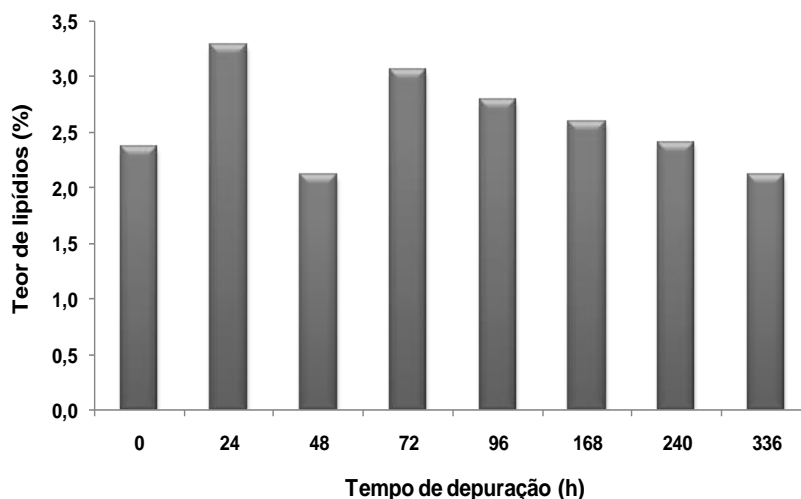


Figura 5.8 Média do teor de lipídios em cada tempo do bioensaio.

A diferença entre a concentração final e inicial em relação ao somatório dos HPAs totais foi de $749,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados para os compostos individuais de todas as replicatas estão reportados nos Anexo VI e VII.

A concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no tecido de esponjas variou minimamente até T96, sendo mais significativa e acentuada após T168 (Figura 5.9). A taxa de depuração calculada foi de $2,6 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ após T96. A variação da concentração dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$) em função do tempo de depuração é ilustrada na Figura 5.10, a qual salienta a redução significativa dos HPAs a partir de T168. Apesar dos dados até T96 não apresentarem uma tendência de variação, o ajuste linear do conjunto de resultados é caracterizado por elevado r , significativo a $p < 0,05$. O ajuste linear foi escolhido para estimativa da taxa de depuração global ($1,95 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), uma vez que o teste para cinética de segunda ordem não foi significativo.

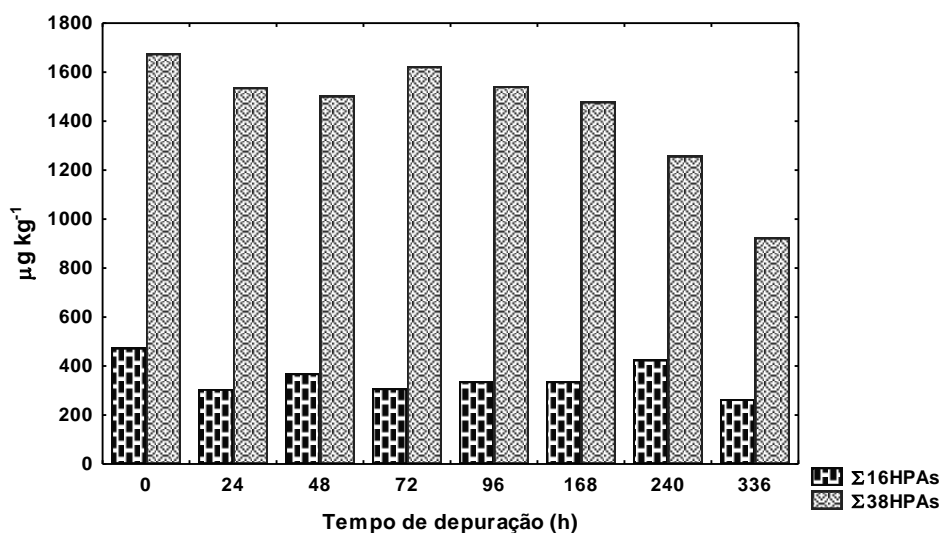


Figura 5.9 Variação das somas dos HPAs durante o bioensaio de depuração.

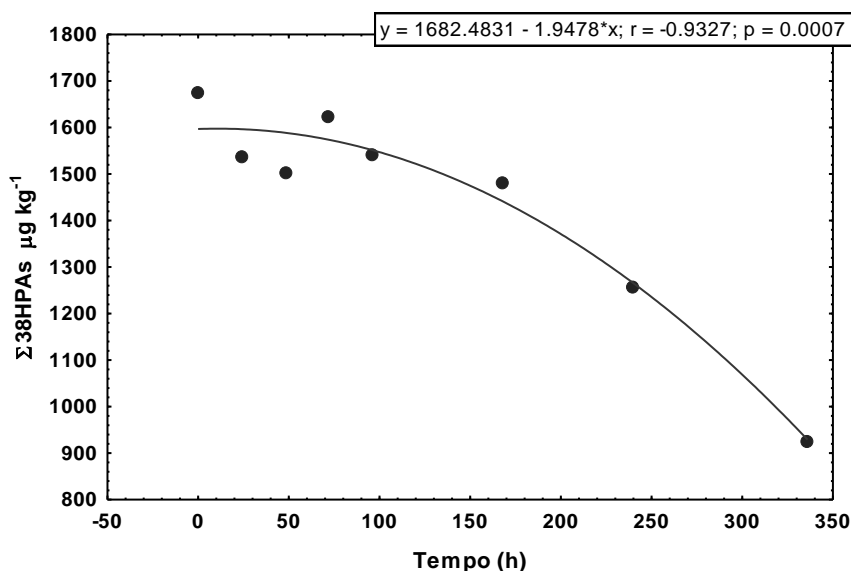


Figura 5.10 Variação de HPAs totais com tempo de depuração.

Uma significativa depuração não é notada para os HPAs prioritários (Σ16HPAs), os quais variaram muito pouco, o que não é perceptível na Figura 5.9. Logo, os demais HPAs, principalmente os homólogos alquilados, foram os maiores contribuintes para a depuração. Além disso, esta é mais acentuada em compostos alquilados de alta massa molecular. Não há uma explicação para que as esponjas eliminem preferencialmente os HPAs alquilados; talvez pelo motivo da metilação destes compostos. Há uma maior facilidade na quebra da ligação entre o radical metila ($-\text{CH}_3$) e o anel aromático do que entre os próprios anéis

condensados, que são mais estáveis. A Figura 5.11 ilustra um exemplo de um HPA parental, o dibenzotiofeno, e sua série homóloga, revelando maior atenuação da concentração com o aumento do tempo de depuração e do peso molecular destes compostos.

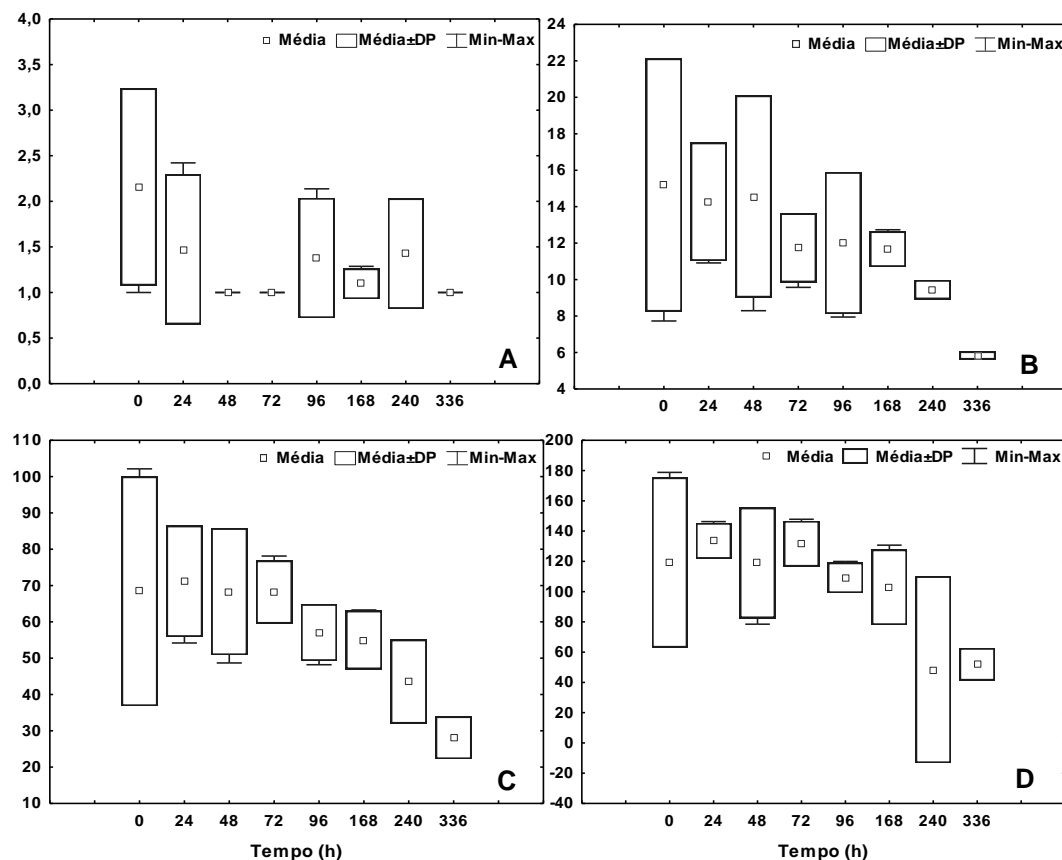


Figura 5.11 Variação das concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos dibenzotiofenos nas replicatas de esponja conforme o tempo de depuração. A – DBT; B – C1DBT; C – C2DBT; D – C3DBT.

A curva do somatório das concentrações deste HPA e seus homólogos em função do tempo de depuração é mostrada na Figura 5.12. A elevada correlação entre o somatório dos dibenzotiofenos e o tempo de depuração comprova a depuração mais significativa a partir de T168 e que varia lenta e gradativamente nas primeiras 96 h.

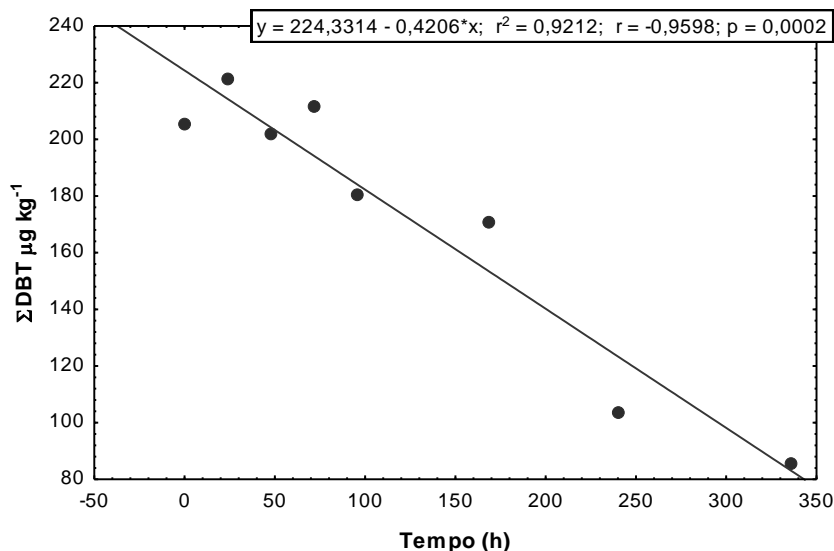


Figura 5.12 Correlação do somatório dos dibenzotiofenos com o tempo de depuração.

As Figuras 5.13 e 5.14 ilustram a distribuição dos HPAs leves e pesados nas amostras de esponja ao longo do bioensaio de depuração, considerando apenas os 16HPAs e com os totais, respectivamente. A contribuição de HPAs de alto e baixo peso molecular, considerando apenas os 16 HPAs prioritários, revela uma maior contribuição pirogênica. Com o somatório dos 38 HPAs, as concentrações dos compostos leves cresceram em relação aos pesados em quase todas as amostras, revelando influência petrogênica. Mais uma vez fica evidente a relevância da determinação dos compostos alquilados na identificação de fontes. Apenas nos dois últimos períodos do experimento não ocorreu esta predominância, quando pode ter ocorrido a depuração dos compostos leves em comparação aos níveis apresentados no início do bioensaio.

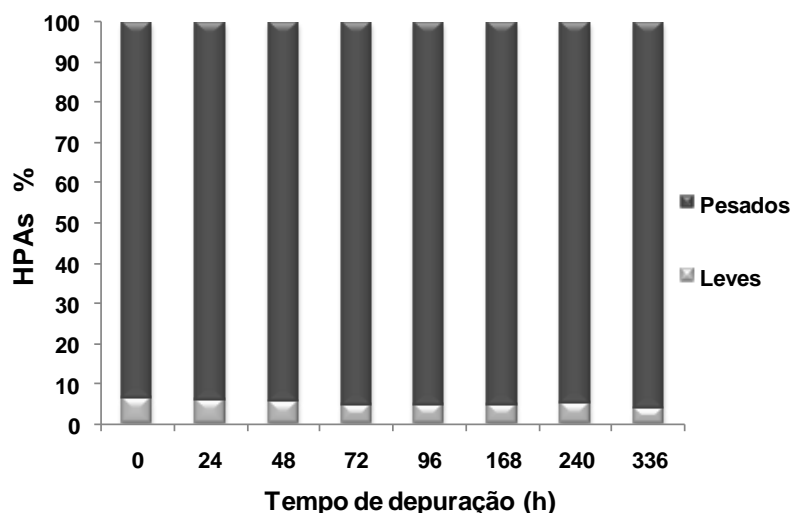


Figura 5.13 Distribuição dos HPAs leves e pesados, considerando apenas os 16 HPAs.

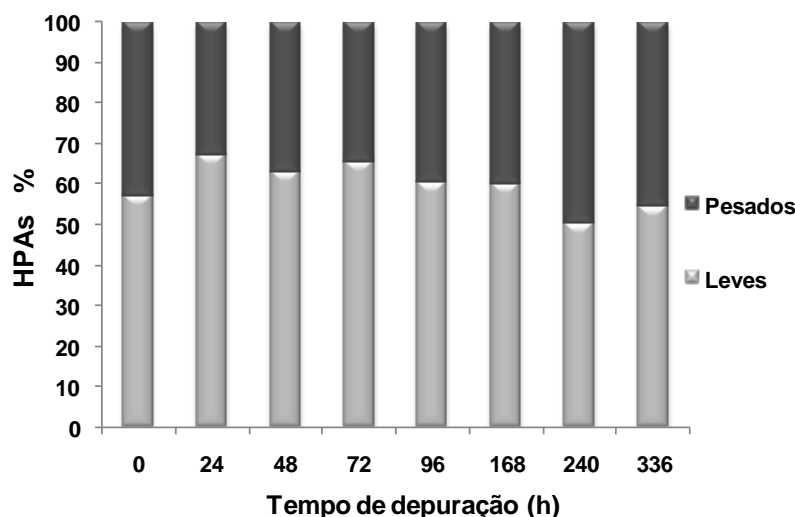


Figura 5.14 Distribuição dos HPAs leves e pesados, considerando os HPAs totais.

A Figura 5.15 apresenta a variação das replicatas em cada tempo de ensaio. A concentração dos HPAs totais ($\sum 38\text{HPAs}$) apresentou um amplo desvio no tempo 0h, o qual se reduz no tempo de experimento, alcançando o mínimo em 336h, quando ocorreu uma menor variação entre os indivíduos na depuração dos HPAs. Por serem indivíduos diferentes, as variações foram esperadas, pois a resposta dos organismos dentro de uma população não é igual. O segundo bioensaio de depuração foi realizado apenas para comprovar a tendência de depuração entre os espécimes de esponja, como mostra a Figura 5.16. A diminuição significativa dos HPAs também ocorreu a partir de T168. A

concentração dos HPAs prioritários se manteve na mesma faixa ao longo do experimento, assim como no primeiro bioensaio de depuração, atribuindo aos HPAs totais a razão pelas reduções significativas na concentração. Entretanto, a variação desta nos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$) das replicatas de esponja não foi atenuada com o aumento do tempo de depuração, como ocorreu no primeiro bioensaio, no qual a variação das replicatas foi muito menor. Não houve diferença significativa entre a depuração dos HPAs e o tempo de bioensaio.

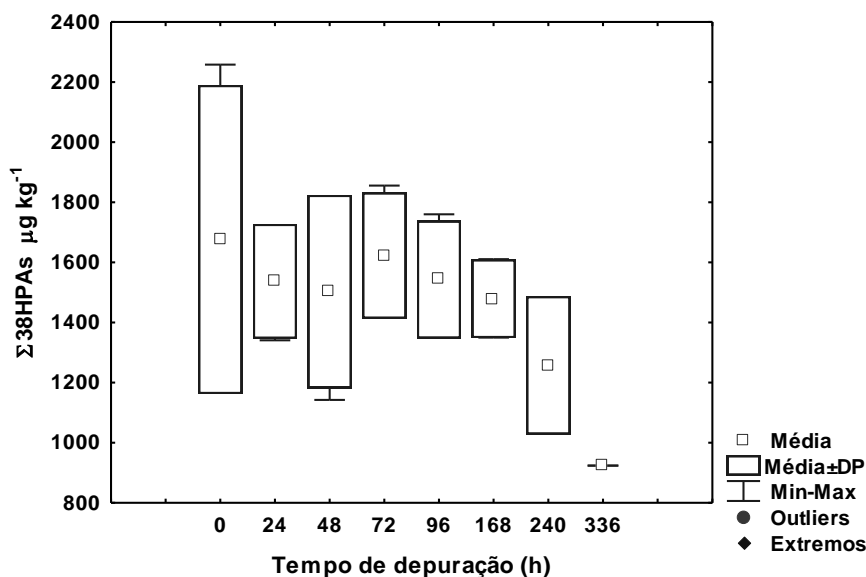


Figura 5.15 Variação dos HPAs totais ao longo do 1º ensaio de depuração.

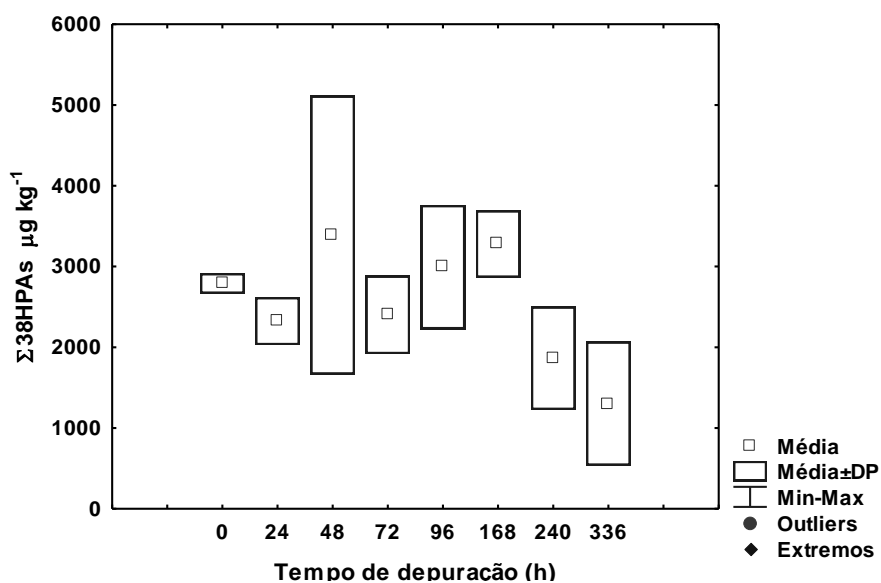


Figura 5.16 Variação dos HPAs totais ao longo do 2º ensaio de depuração.

Amostras foram agrupadas, separando os tempos de bioensaio em dois grupos: 0-96h e 168-336h, para melhor comparação entre os tempos e melhor interpretação e visualização da depuração (Figura 5.17). As médias diferem por $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ e esta diferença é significativa ($p=0,032$), segundo o teste de Mann-Whitney.

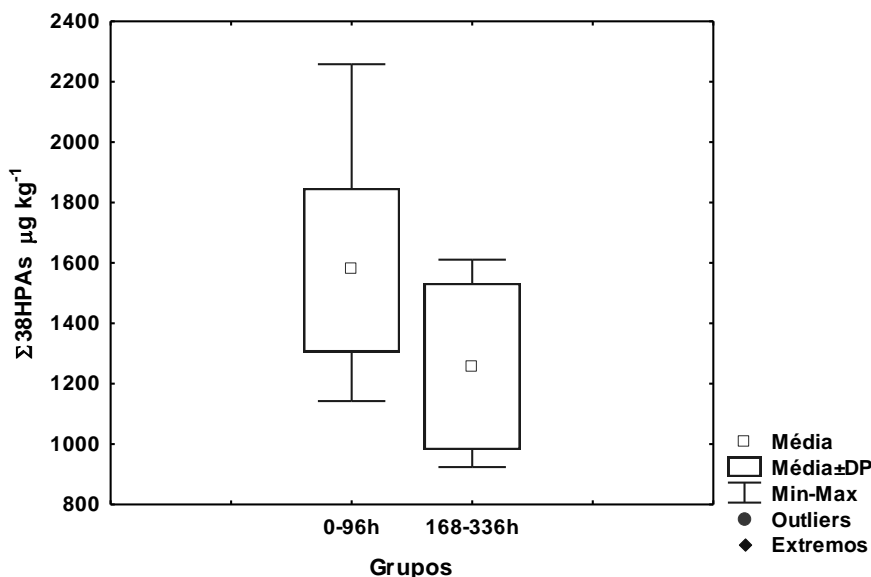


Figura 5.17 Variação dos HPAs totais em amostras agrupadas.

A variação da concentração de cada HPA nas replicatas de esponja no T0 (amostra de campo) e no tempo T336 é ilustrada na Figura 5.18. Nota-se que os desvios foram reduzidos ao longo do experimento, como discutido anteriormente. O desvio padrão das esponjas no T336 foi bem inferior quando comparado com as amostras de campo. Isto mostra que, as esponjas podem depurar os HPAs e a variabilidade da concentração dos HPAs se torna menor, fazendo com que as replicatas sejam representativas da população de esponjas. Os compostos alquilados foram os principais responsáveis para a redução da concentração dos HPAs leves durante o bioensaio, enquanto os compostos parentais contribuíram para a diminuição dos HPAs de mais alta massa molecular. Os compostos alquilados variaram entre 61 e 77 % do somatório dos HPAs totais. Os HPAs alquilados de fenantreno e dibenzotiofeno foram os mais representativos, especialmente o C3Fenantreno e o C3Dibenzotiofeno, que foram os mais abundantes em todas as replicatas. A alta contribuição dos alquilados caracteriza a contaminação petrogênica das amostras (Boehm, 1984). As tipologias dos HPAs

assim como as replicatas dos demais tempos de depuração estão nos anexos VIII ao XIII.

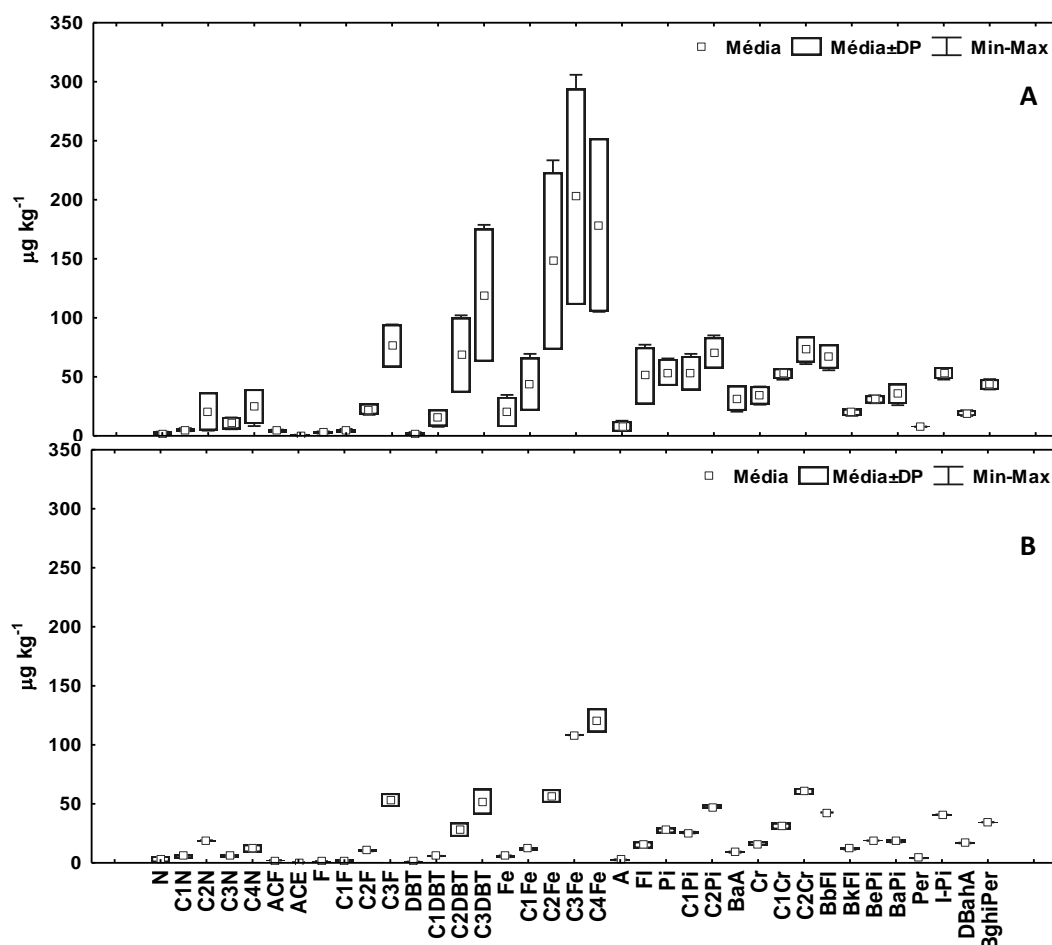


Figura 5.18 Tipologia da variação das replicatas nos tempos T0 (A) e T336 (B).

5.2.2. Acumulação

5.2.2.1. Concentração de HPAs em amostras de água e filtro

A média das concentrações em T0 nas amostras de água e de filtro para os 16 HPAs prioritários ($\sum 16\text{HPAs}$) e os HPAs totais ($\sum 38\text{HPAs}$) foi de 219,5 ng L⁻¹ e 392,6 ng L⁻¹ e de 231,8 ng L⁻¹ e 718,2 ng L⁻¹, respectivamente. As concentrações dos HPAs individuais são apresentadas no Anexo XIV.

Verificou-se a tipologia dos HPAs nas amostras de água e filtro (Figura 5.19) para analisar as concentrações às quais as esponjas estavam expostas no

ambiente. As amostras de água (T0 – campo) de Itaipu apresentaram influência pirogênica, ou seja, são constituídas em sua maioria de HPAs parentais e de compostos de 4 a 6 anéis aromáticos, segundo critérios estabelecidos por Boehm (1984). A amostra de filtro apresentou 68% de HPAs alquilados e considerando apenas os 16 HPAs, 92% dos HPAs quantificados foram compostos pesados. Esta alta contribuição dos HPAs pesados foi discutida anteriormente para as amostras de depuração, no item 5.2.1.1., como a tendência destes a adsorver em partículas. Houve ainda uma alta concentração dos compostos alquilados de compostos leves, cuja proporção foi a 59%, que sugere um componente petrogênico, com dois tipos de óleo: degradado, com distribuição $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$, e recente, em formato de sino, como é o caso da série do fenantreno. Estes dois tipos de óleo presentes na amostras indicam fonte natural para as séries de alquilados. Pode-se dizer que há uma mistura de fontes em Itaipu, com maior tendência a hidrocarbonetos de origem petrogênica.

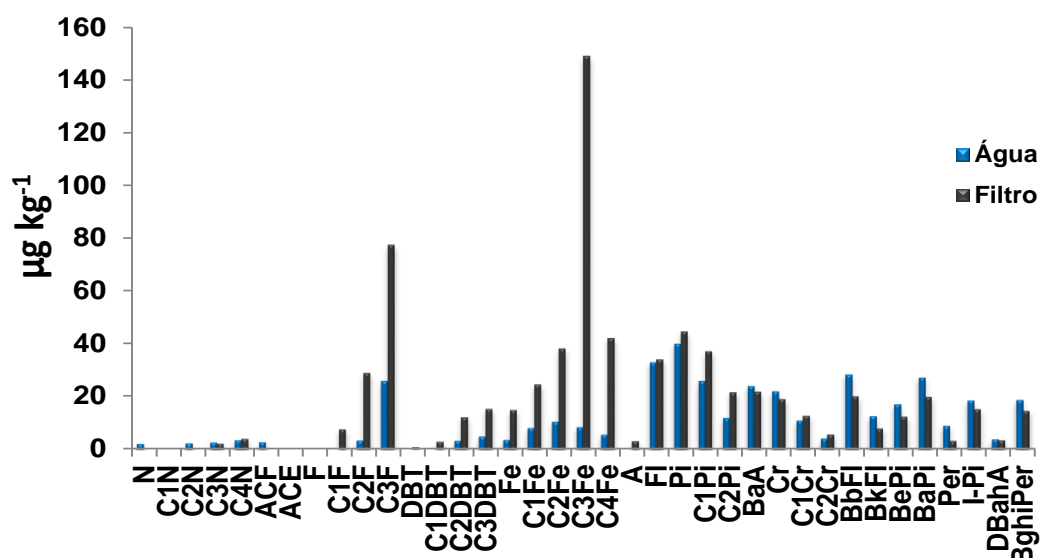


Figura 5.19 Tipologia dos HPAs em amostras de campo de água e filtro.

O teste para verificar possíveis perdas na concentração do criseno durante o bioensaio, sem utilizar as esponjas nos aquários, foi realizado e mostrou que em 96h, 30% da concentração inicial do criseno são perdidas por volatilização ou aderência nos vidros do aquário. Não foi possível calcular a taxa de volatilização, devido à baixa recuperação das amostras nos tempos 24h e 48h. Os valores do criseno mensurados na água são reportados no Anexo XV.

5.2.2.2.

Teor de lipídios e concentração de HPAs em esponja

O teor de lipídios variou entre 2,74 a 4,04 % (Figura 5.20) em indivíduos diferentes, enquanto no mesmo indivíduo a variação foi de 1,59 a 3,98 % (Figura 5.21). Sabe-se que os HPAs são contaminantes lipofílicos, logo tendem a se ligar mais facilmente a substâncias lipídicas e como já discutido no item 5.1.2, a eliminação e a acumulação destes contaminantes podem ser influenciadas pelo teor de lipídios. Em relação aos diferentes indivíduos de esponja deste estudo, o perfil do aumento do teor de lipídios, seguido de um decréscimo em T96, pode ser comparado à variação da concentração de HPAs no tecido. O decréscimo do teor de lipídios no mesmo indivíduo, é grande entre T0 e T24 e depois pouco varia, pode ser explicado pela perda de tecido durante o experimento, já que partes da esponja foram retiradas do mesmo indivíduo. Além disso, a redução pode ser atribuída ao estresse que esta remoção pode ter causado.

A relação entre o teor de lipídios e a concentração do criseno no tecido das esponjas em diferentes indivíduos mostrou uma correlação significativa ($r= 0,95$ a $p<0,05$), através da matriz de correlação, ilustrada na Figura 5.22.

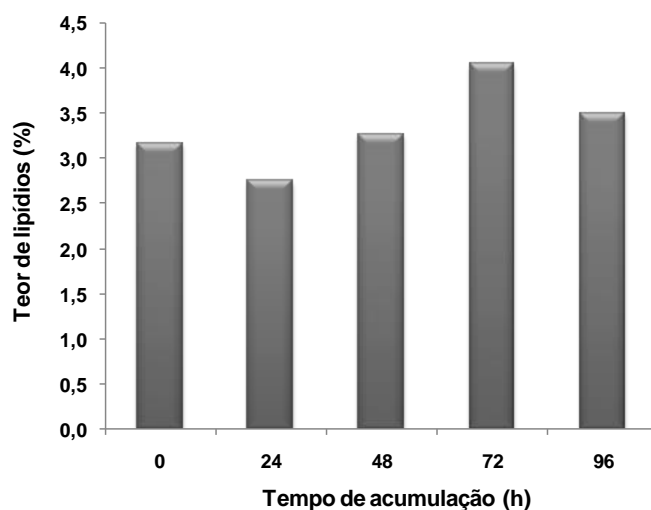


Figura 5.20 Teor de lipídios do mesmo indivíduo durante exposição ao criseno.

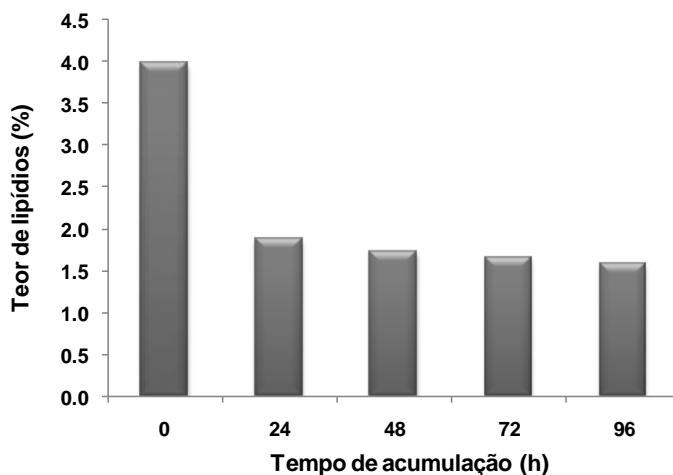


Figura 5.21 Teor de lipídios do mesmo indivíduo durante exposição ao crisco.

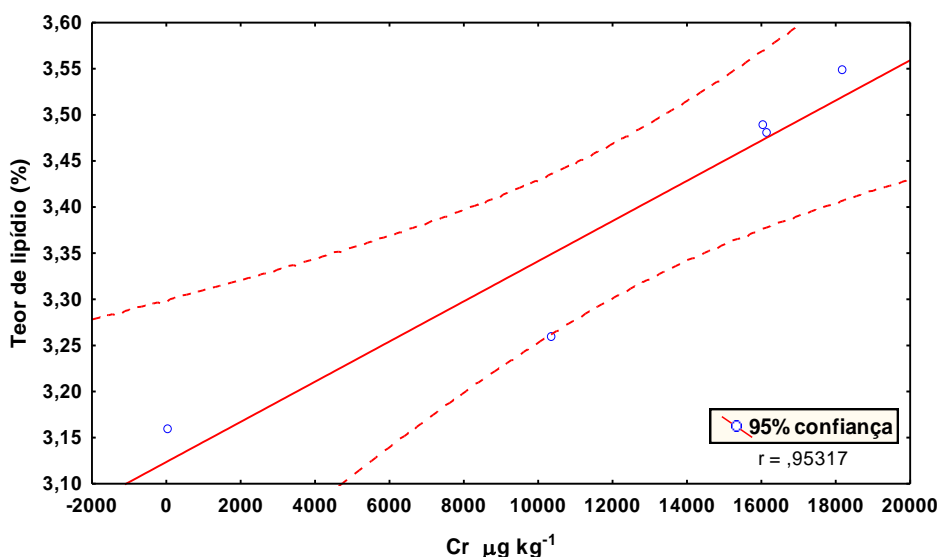


Figura 5.22 Correlação entre o teor de lipídios e a concentração do crisco.

A concentração do crisco acumulado variou entre 4729,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 7992,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no mesmo indivíduo e entre 10330,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 18172,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em indivíduos diferentes durante o bioensaio. As concentrações dos compostos individuais estão reportadas nos Anexos XVI e XVII.

A concentração do crisco no tecido da esponja *Hymeniacidon heliophila* aumentou durante o bioensaio de acumulação (Figura 5.23). Houve rápida e intensa acumulação nas primeiras 24 h e após este tempo, a concentração aumentou gradativamente, no mesmo indivíduo da esponja. Em diferentes indivíduos, a concentração do crisco diminuiu no último tempo do bioensaio (Figura 5.24). A concentração do crisco em diferentes indivíduos resultou no

dobro da concentração deste HPA no mesmo indivíduo. Isto pode ser interpretado como uma paralisação parcial da filtração de água. Após a retirada de parte da esponja em T0, pode ser que tenha havido um direcionamento de energia para reparar o tecido perdido, reconstruindo os canais aquíferos e toda a estrutura tecidual. Outros possíveis efeitos serão discutidos posteriormente, com a contribuição dos dados dos biomarcadores, no item 5.2.3.

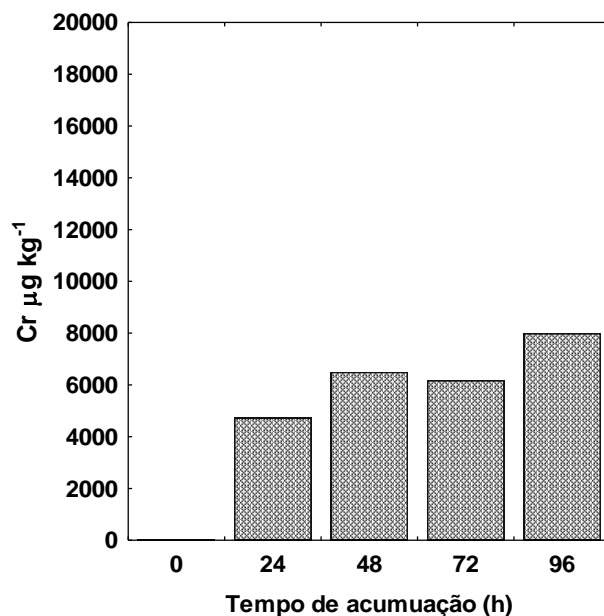


Figura 5.23 Variação da exposição ao criseno no mesmo indivíduo de esponja.

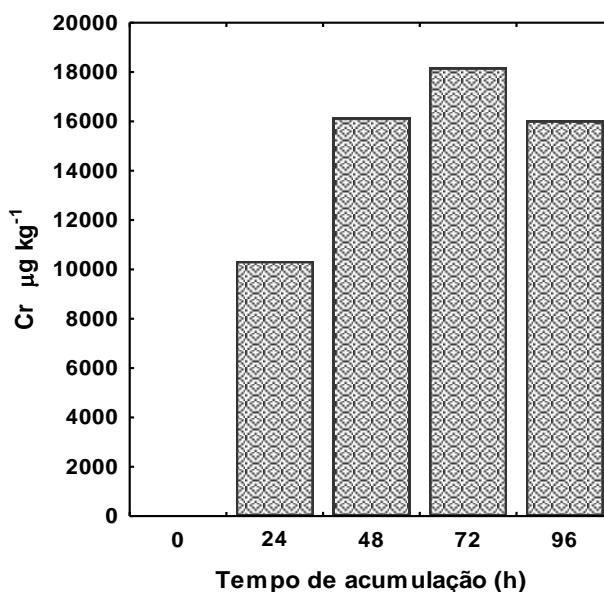


Figura 5.24 Variação da exposição ao criseno em diferentes indivíduos de esponja.

Glyzina *et al.* (2002) expuseram a esponja de água doce *Lubomirskia baicalensis* ao antraceno e pireno a uma concentração final de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ na água do aquário. Esta espécie mostrou grande sensibilidade e capacidade de acumular estes HPAs em 36 h, retirando da água cerca de 90 % da concentração. Além disso, o decremento desses compostos na água foi proporcional ao aumento da massa da esponja. No presente estudo, não foi notada variação e correlação do volume de esponja com o aumento da concentração no tecido. A variação da concentração de criseno no mesmo indivíduo e em diferentes indivíduos é ilustrada na Figura 5.25 e 5.26, respectivamente. A espécie *Hymeniacidon heliophila* mostrou-se capaz de acumular elevadas concentrações de criseno, mostrando-se apta como biomonitora de HPAs. A taxa de acumulação em diferentes indivíduos, de $250 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$, foi relativamente alta, quando comparada à taxa de depuração. Apesar disso, as esponjas incorporaram ao longo do experimento cerca de 15 % da quantidade do criseno disponível nos aquários.

A Figura 5.27 mostra a comparação da concentração do criseno no tecido da esponja *H. heliophila* nos bioensaios de depuração e acumulação. A variação da concentração deste HPA durante a depuração não pode ser visualizada, pois os valores acumulados foram relativamente muito altos. Portanto, a esponja pode suportar altas concentrações de HPAs e pode ser considerada como biomonitora destes xenobióticos.

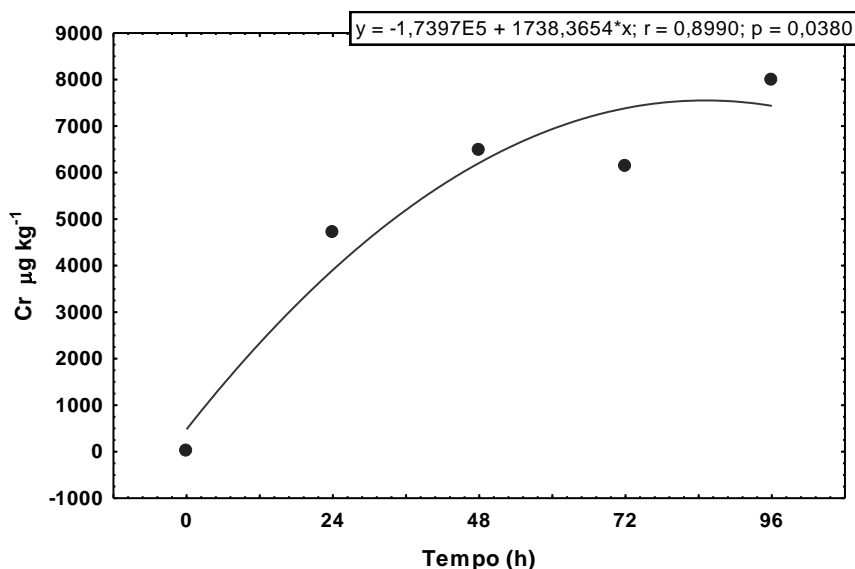


Figura 5.25 Correlação entre concentração de criseno no mesmo indivíduo e tempo de exposição.

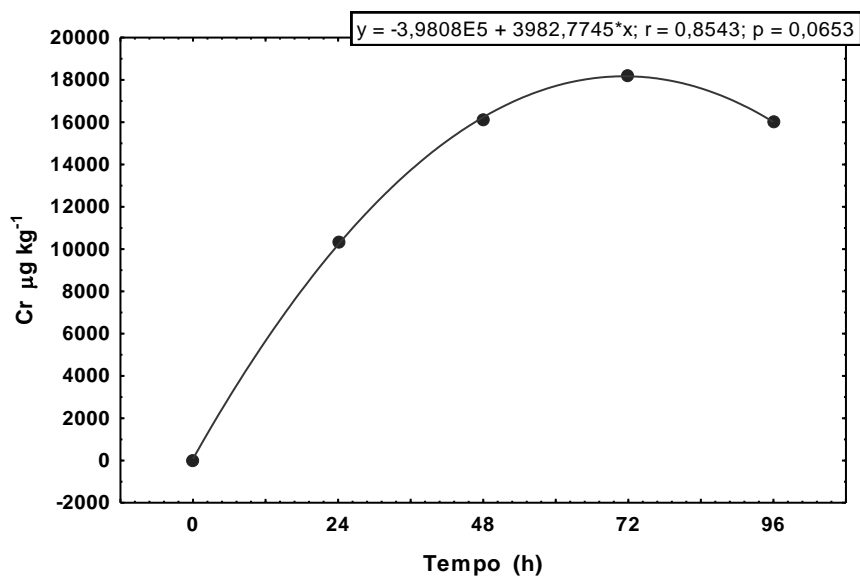


Figura 5.26 Correlação entre concentração de criseno em diferentes indivíduos e tempo de exposição.

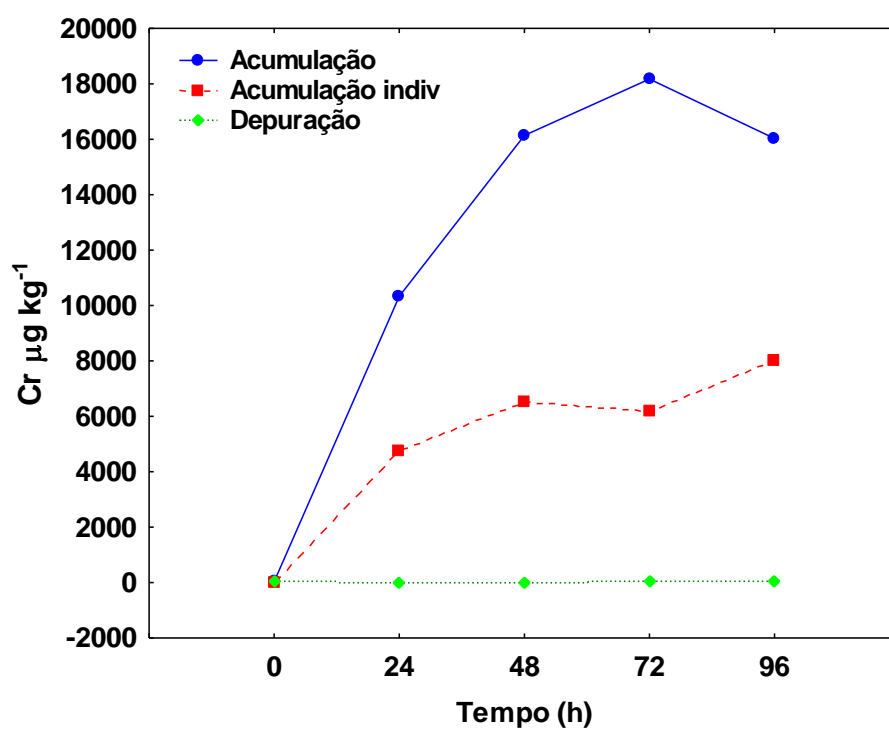


Figura 5.27 Variação do criseno durante os bioensaios de depuração e acumulação até T96.

5.2.3. Biomarcadores

5.2.3.1. Vermelho Neutro

O tempo de retenção do vermelho neutro permaneceu em 120 min durante todo o bioensaio. Isto deve-se ao fato de que, mesmo retirando os indivíduos de esponja de um local consideravelmente contaminado e transferindo-os para aquários, contendo água limpa, uma condição para que possam diminuir o estresse do ambiente de origem, as células permaneceram no estado de saúde que se encontravam no campo.

O tempo de retenção do vermelho neutro diminuiu ao longo do ensaio de acumulação, apresentando uma boa correlação com o tempo de exposição amostra de indivíduos diferentes e no mesmo indivíduo (Figura 5.28). Em uma célula saudável, o tempo de retenção do vermelho neutro é de 150 a 180 minutos para o mexilhão *Perna perna* (Lima, 2001). Em 96 h de ensaio, a saúde das esponjas diminuiu significativamente, devido à redução do tempo de retenção, ficando retido o corante vermelho neutro em menor tempo nos lisossomos (Figura 5.29).

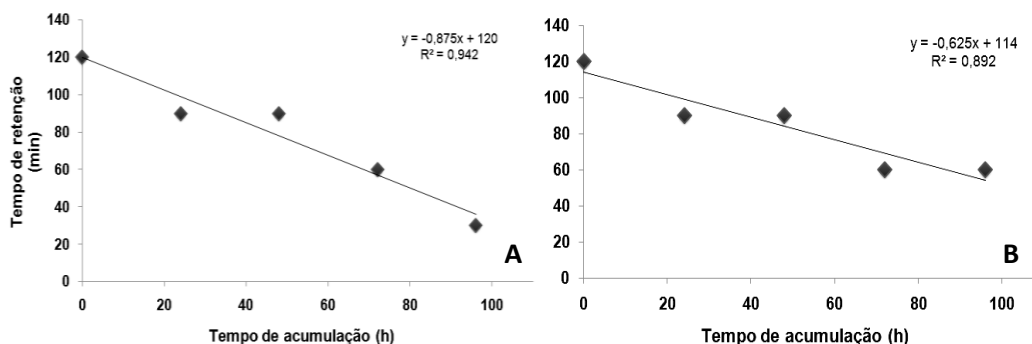


Figura 5.28 Variação do tempo de retenção do vermelho neutro em indivíduos diferentes (A) e no mesmo indivíduo (B), conforme tempo de exposição.

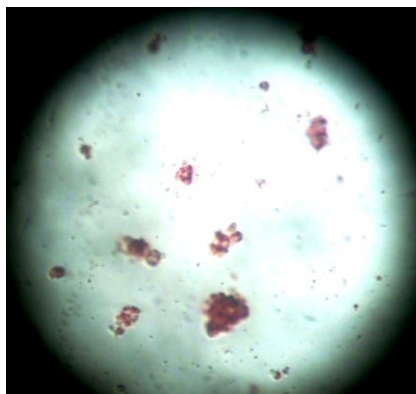


Figura 5.29 Vermelho neutro no interior das células da esponja exposta ao criseno em T96 de indivíduo diferente.

No ensaio de acumulação, o tempo de retenção do vermelho neutro (TR-VN) diminuiu em ambos os grupos testados. No final do experimento, este tempo permaneceu em 60 min para o mesmo indivíduo de esponja, embora a concentração do criseno tenha aumentado (Figura 5.30). Pode-se dizer que em geral houve decréscimo do TR-VN com aumento da concentração de criseno, embora nem sempre pareado. Mesmo assim, há correlação negativa e significativa pelo teste de Spearman ($-0,949$ a $<0,05$), o que confirma estatisticamente variação do TR-VN com o aumento da concentração do criseno e o efeito deste HPA sobre as células de esponjas. Tal correlação não foi observada no grupo de diferentes indivíduos, já que o TR-VN diminuiu constantemente apesar da concentração do criseno no último tempo de ensaio (T96), diminuir (Figura 5.31), possivelmente, pelo fato de se tratar de indivíduos diferentes com respostas distintas.

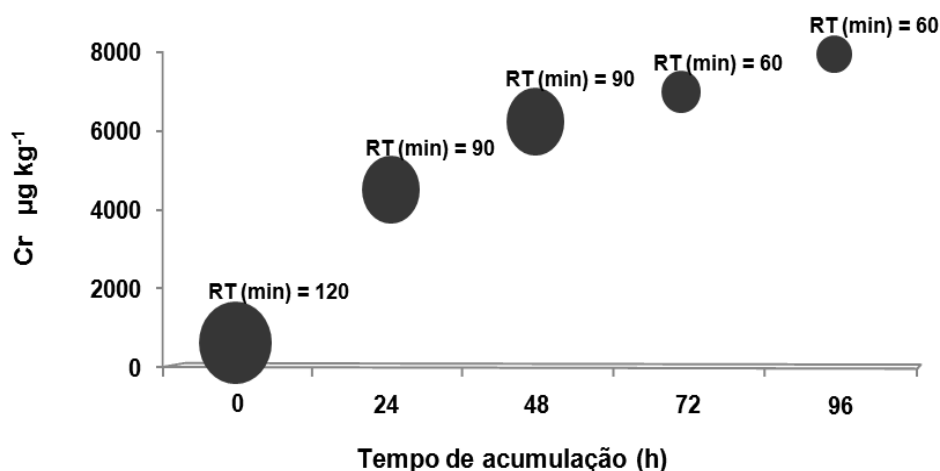


Figura 5.30 Tempos de retenção do vermelho neutro conforme concentração de criseno ao longo do ensaio de acumulação (mesmo indivíduo).

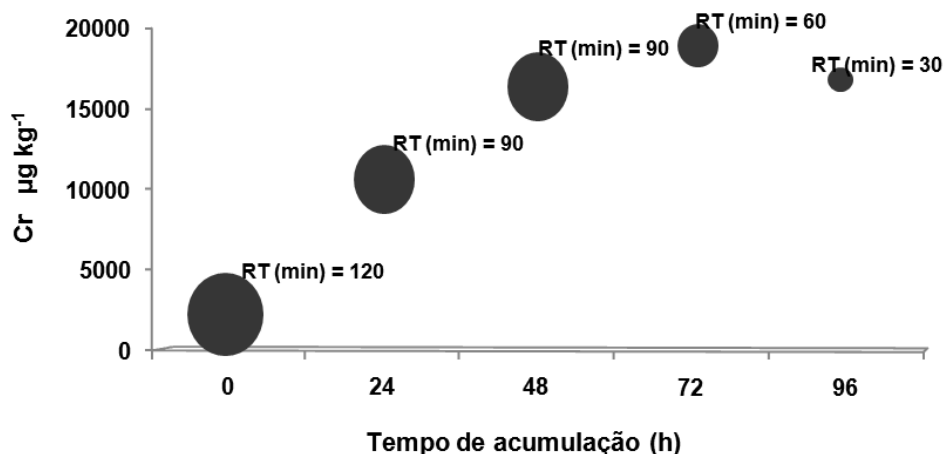


Figura 5.31 Tempos de retenção do vermelho neutro conforme concentração de criseno ao longo do ensaio de acumulação.

A Fig 5.32 ilustra a correlação entre a concentração do criseno e o TR-VN, que foi relativamente elevada. A correlação entre a concentração do criseno e TR-VN foi menos importante quando se tratou de indivíduos diferentes, pois estes podem apresentar respostas diferenciadas quanto à acumulação (Figura 5.33). Apesar disso, a correlação pode ser considerada boa, por se tratar de um biomarcador cuja variação altamente proporcional em relação à exposição é raramente obtida. A aplicação do teste no mesmo indivíduo para avaliar o biomarcador vermelho neutro mostrou melhor proporcionalidade.

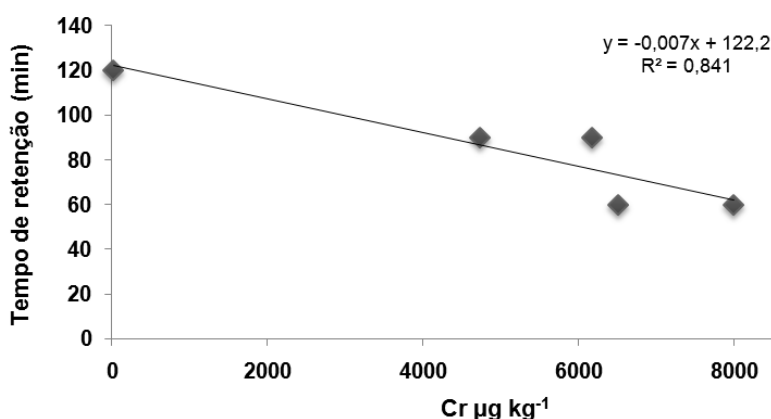


Figura 5.32 Correlação entre o tempo de retenção do vermelho neutro no mesmo indivíduo e a concentração de criseno.

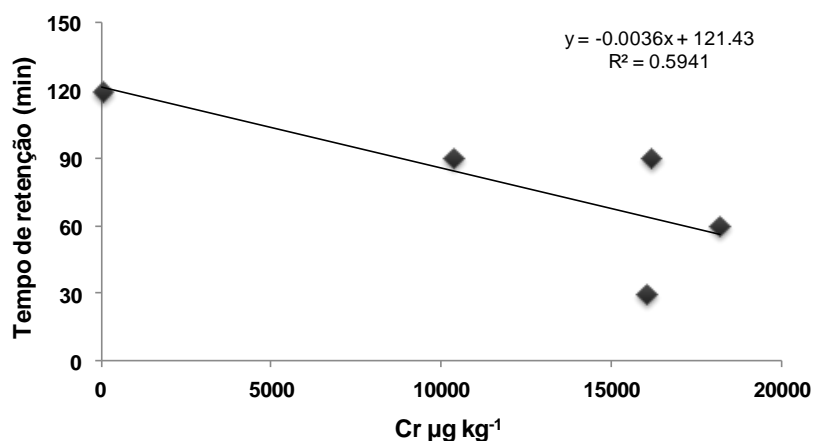


Figura 5.33 Correlação entre o tempo de retenção do vermelho neutro em indivíduos diferentes e a concentração de criseno.

5.2.3.2. Micronúcleo

O ensaio do micronúcleo não teve êxito, devido à alta associação das células. As células foram extraídas com sucesso e as lâminas foram muito bem confeccionadas, porém a alta densidade das células e a falta de dissociação das mesmas fizeram com que não fosse possível identificar com precisão os micronúcleos. Novos testes serão realizados para aperfeiçoar para separar mais eficientemente as células com uso de solução salina após extração.

5.2.3.3. Glutathiona

A glutathiona (GSH) é uma proteína que indica o nível de estresse oxidativo ocasionado por um determinado fator que induz sua expressão (Hayes *et al.*, 2005). Durante o bioensaio de depuração, níveis de GSH variaram ao longo do experimento, não apresentando uma correlação (Figura 5.34). Esperava-se que a expressão da GSH reduzisse, pois as esponjas foram mantidas em aquários sem contaminantes que pudessem ter induzido a GSH e estes organismos foram capazes de depurar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Isto pode ser explicado pelos seguintes fatores: 1) não há uma linearidade na expressão de GSH devido às amostras serem de espécimes diferentes, logo, cada indivíduo apresenta um nível de resposta distinto; 2) o estresse dos espécimes de

permanecerem em aquário por muito tempo sem material particulado pode ter feito com que os níveis de GSH aumentasse um pouco, conservando sua ação protetora. Não houve correlação entre o aumento da GSH e a redução da concentração de HPAs totais ($\Sigma 38$ HPAs) e nem com o somatório dos 16 HPAs prioritários ($\Sigma 16$ HPAs).

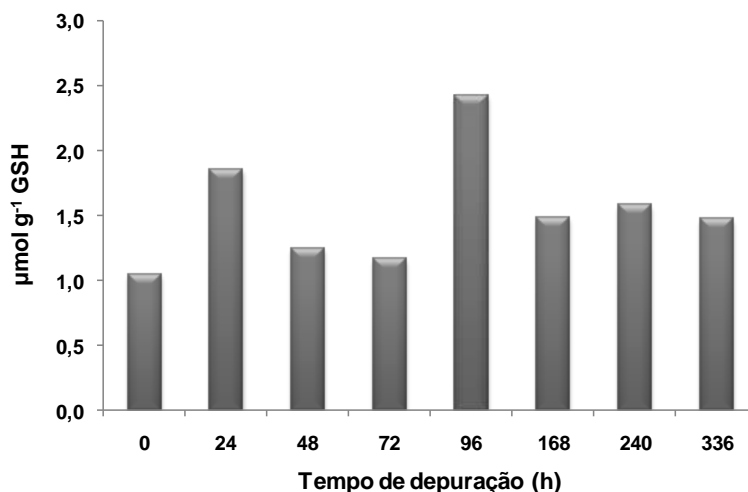


Figura 5.34 Média da expressão da glutathione em esponja durante depuração.

No ensaio de acumulação, a expressão de glutathione (GSH) em diferentes indivíduos é diretamente proporcional à concentração de criseno, ao longo do experimento (Figura 5.35). A elevada expressão da GSH em T0 ocorreu, possivelmente, devido: 1) à influência de outros contaminantes presentes no ambiente, uma vez que a concentração de criseno em campo é muito inferior àquela utilizada nos aquários; 2) ao fato de ser um espécime diferente com resposta distinta; 3) ao possível estado de saúde deste indivíduo, que poderia estar com elevado estresse oxidativo ou 4) à possibilidade de corresponder ao nível basal, antes da intervenção ou alteração no meio. Em T24, a expressão da GSH do indivíduo foi relativamente baixa, ocasionando, provavelmente, em uma rápida e intensa acumulação do criseno. Após este tempo, a acumulação do HPA foi gradativa e acompanhada por um crescimento dos níveis de GSH, retornando possivelmente ao nível basal. Sua indução pode ter acontecido para reduzir as concentrações do criseno no tecido da esponja, através da conjugação e, consequentemente, eliminar este HPA. No último tempo do experimento, a elevada expressão da GSH refletiu o decréscimo na concentração do criseno. Isto

indica que é necessário um determinado limite mínimo de produção de GSH para que a depuração sobrepassasse a acumulação. A eliminação pode ter acontecido durante o experimento, mas deve ter sido mínima, não sendo perceptível. A conjugação da glutatona (GSH) com os xenobióticos, como os HPAs, que permite a depuração, pois os tornam mais solúveis na água, é espontânea ou é catalisada pela enzima glutatona-S-transferase (GST) (Hayes *et al.*, 2005).

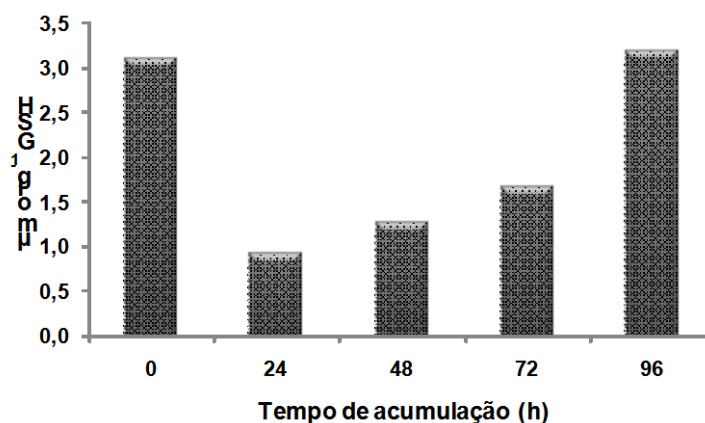


Figura 5.35 Variação de glutatona em diferentes indivíduos de esponja durante exposição ao craveno.

O crescimento da expressão de GSH com o tempo de exposição ao craveno se ajusta bem a uma curva exponencial conforme mostra a Fig 5.36. A correlação entre a GSH e a concentração do craveno foi relativamente baixa, devido à diminuição do nível deste HPA em T96.

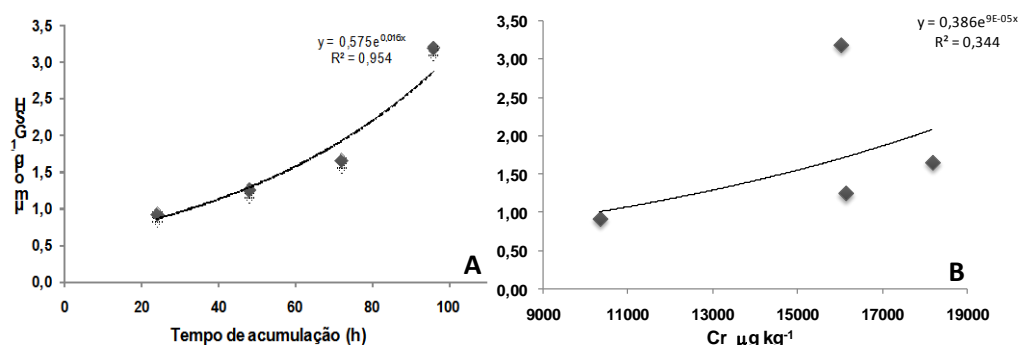


Figura 5.36 Correlação entre a glutatona e tempo de exposição (A) e concentração do craveno (B) em diferentes indivíduos de esponja.

Ao contrário do que ocorreu com a glutatona em diferentes indivíduos, a expressão da glutatona diminuiu no mesmo indivíduo (Figura 5.37). Como partes

da esponja foram retiradas em cada tempo de acumulação, provavelmente, houve um direcionamento de energia para a esponja reparar o tecido perdido, reconstruindo os canais aquíferos. Logo, a concentração do criseno aumentou, mas menos do que no teste com diferentes indivíduos, em função do mesmo processo de restauração, e houve inibição da expressão da GSH. As correlações da GSH com o tempo e exposição ao criseno são bastante altas (Figura 5.38). O teste com diferentes indivíduos mostrou melhor resposta em relação à GSH.

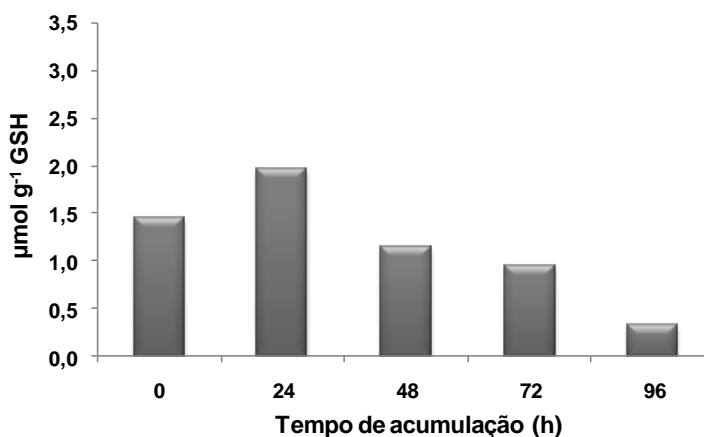


Figura 5.37 Variação de glutathiona no mesmo indivíduo de esponja.

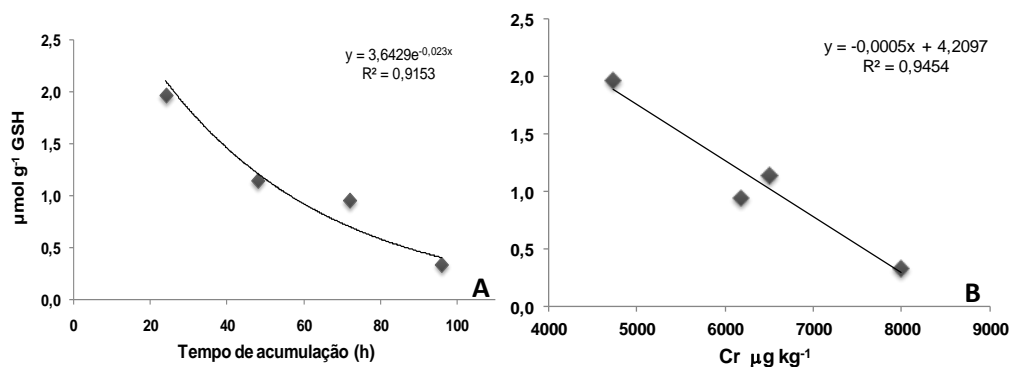


Figura 5.38 Correlação da inibição da glutathiona com o tempo (A) e com a acumulação do criseno (B) no mesmo indivíduo de esponja.

5.2.3.4. Análises histológicas

A quantidade relativa de cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) foi reduzida durante o bioensaio de depuração (Figura 5.39). Esta redução se deve, possivelmente, ao estresse causado pela falta de alimento. Após T96, a esponja mostra pequena recuperação, aumentando e mantendo as

cavidades, mas um novo decréscimo ocorre em T336. Não houve correlação entre a quantidade relativa de cavidades e a concentração dos HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPAs}$) e dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$), apenas com o tempo do experimento. Este biomarcador pode ser considerado como indicativo do estado de saúde das esponjas durante o bioensaio. A contração do tecido da esponja pode ter desorganizado as cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) e estas, muitas vezes, são rompidas. As imagens obtidas dos cortes em cada tempo de ensaio são ilustradas na Figura 5.40. Nota-se que o tecido das esponjas vai se tornando mais denso e espesso por conta da contração deste, ocasionado possivelmente pelo estresse causado durante o bioensaio.

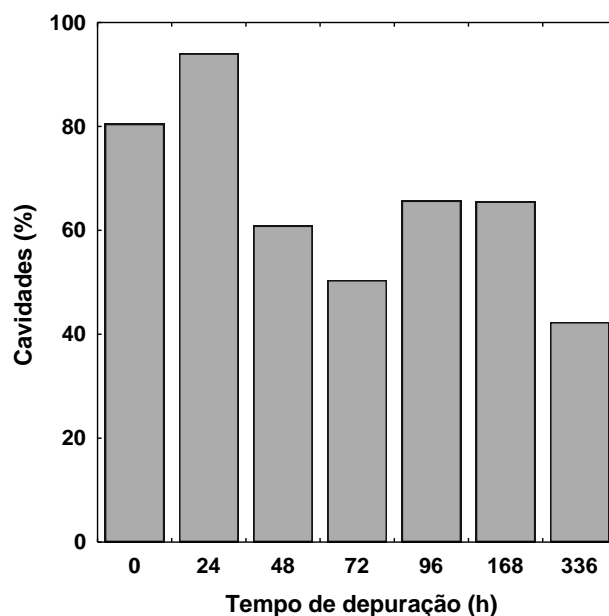


Figura 5.39 Redução das cavidades durante ensaio de depuração.

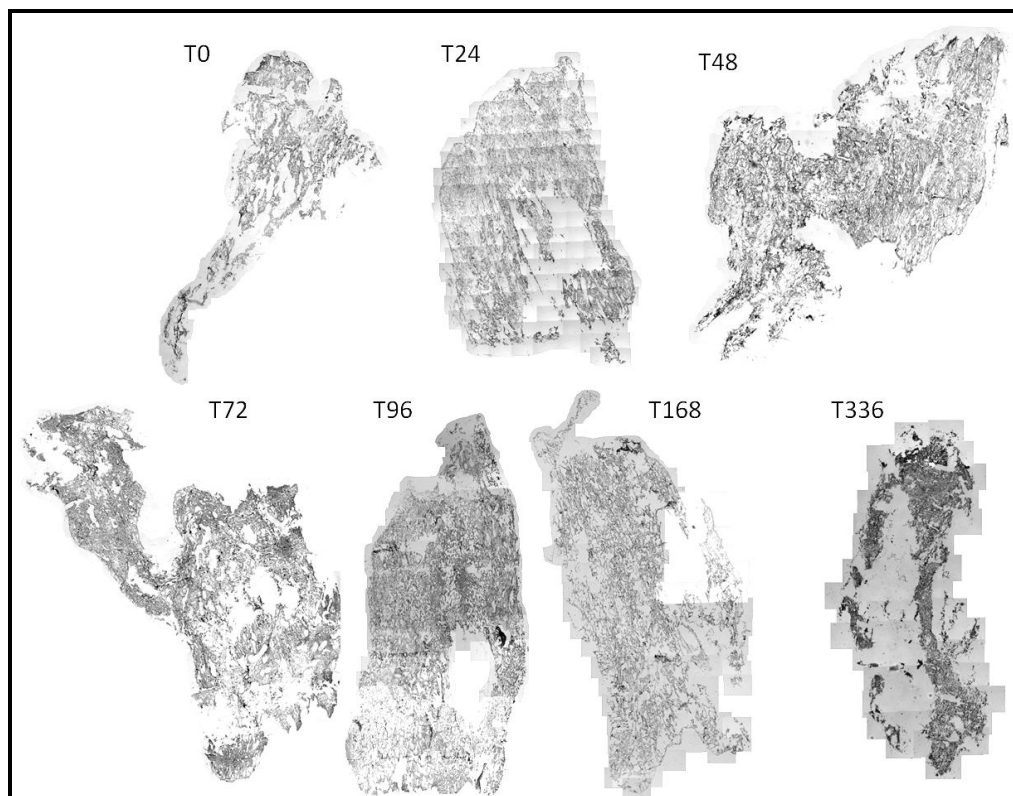


Figura 5.40 Cortes histológicos para a contagem das cavidades durante ensaio de depuração das esponjas.

No ensaio de acumulação, a quantidade relativa de cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) aumentou ao longo do tempo de experimento. Este aumento de cavidades em T96 pode ser interpretado como um processo de regressão, apresentando grandes aberturas.

No corte representativo do T0, as câmaras coanocitárias na esponja foram bastante abundantes e apresentaram tamanho normal, relativamente pequeno. Neste tempo não houve divisão em diferentes tipos de morfologia, pois o corte foi mais homogêneo. O corte histológico de T96 foi dividido cinco partes, três destas características de um tipo de morfologia e as demais de um outro tipo morfológico (Figura 5.41). Na morfologia tipo 1, o tecido encontrou-se contraído, com regiões condensadas e com morfologia alterada, caracterizadas pela desorganização celular e com menor quantidade de câmaras coanocitárias, porém com canais maiores, em comparação com T0. Enquanto na morfologia tipo 2, o tecido apresentou canais aquíferos anormais, com tamanho relativamente maior e apresentou estruturas com grandes aberturas. Este tipo de morfologia nunca foi estudado, uma das teorias é que a esponja ainda pudesse estar em fase de transição

para o estado de contração, e que as estruturas teciduais ainda estivessem em movimentação para tal. Outra possibilidade é o tecido ter sofrido a alteração na morfologia permitindo a esponja aumentar sua capacidade de filtração, por incremento do tamanho dos canais e diminuição no número de câmaras coanocitárias, num esforço para depurar o criseno acumulado no tecido. Em T96, a concentração deste HPA diminuiu, e pode ter sido um resultado da alteração do tamanho dos canais aquíferos, que ficaram maiores. Foi realizado um gráfico com o T0 e com a média ponderada das regiões do T96 (Figura 5.42). A ponderação serve para normalizar a diferença de tamanho das regiões. Não há correlação entre a quantidade relativa de cavidades e a concentração dos HPAs prioritários ($\Sigma 16\text{HPAs}$) e nem dos HPAs totais ($\Sigma 38\text{HPAs}$). As imagens obtidas dos cortes no tempo inicial e final do experimento são ilustradas na Figura 5.43.

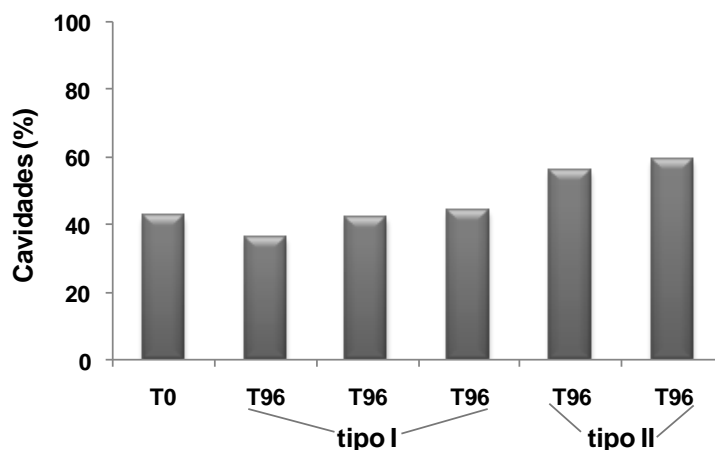


Figura 5.41 Quantidade de cavidades (canais aquíferos e câmaras coanocitárias) durante exposição ao criseno e diferentes tipologias em T96.

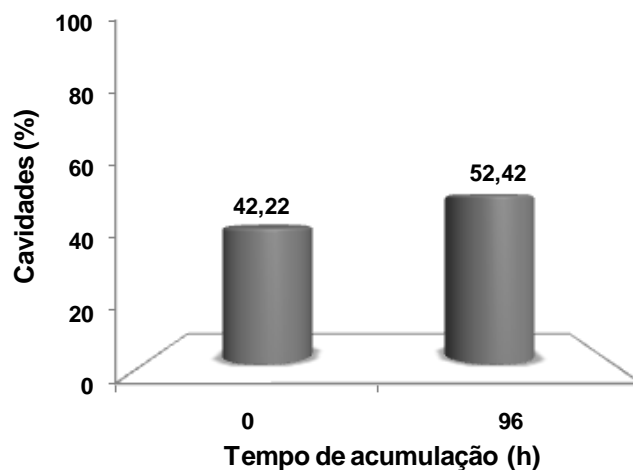


Figura 5.42 Média ponderada da quantidade de cavidades em T0 e T96.

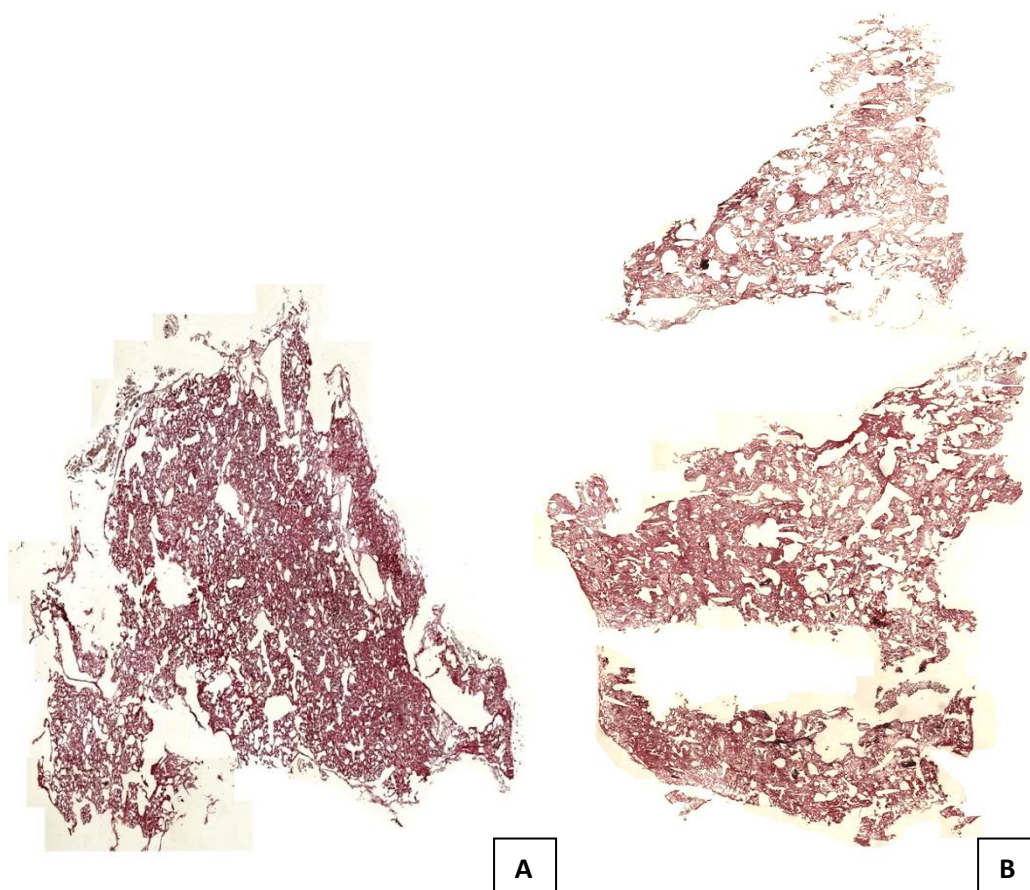


Figura 5.43 Cortes histológicos para a contagem das cavidades em T0 (A) e T96 (B) do ensaio de acumulação.

A proteína colágeno decresceu durante o bioensaio de depuração. Foi realizado um ajuste linear do conjunto de resultados, torando o decaimento estatisticamente significativo ($r = -0.83$, $p < 0.05$). O ajuste linear foi escolhido para estimativa da taxa de redução do colágeno ($0.01\% \text{ h}^{-1}$), uma vez que o teste para cinética de segunda ordem não foi significativo (Figura 5.44). Esta redução ocorreu, provavelmente, devido ao estresse causado pela falta de partículas como alimento. Não há correlação entre os canais e a concentração dos HPAs prioritários ($\sum 16\text{HPAs}$) e nem dos HPAs totais ($\sum 38\text{HPAs}$), apenas com o tempo do experimento. Houve correlação de Spearman negativa (-0.929) e significativa a < 0.05 , em relação ao tempo de depuração. As fibras colágenas diminuíram diferentemente dos HPAs, havendo uma rápida redução até T96 e permanecendo quase constante após este tempo. Enquanto a concentração dos HPAs se manteve até T96 e após teve um decaimento considerável. Este biomarcador pode ser

indicativo da saúde das esponjas em relação ao bioensaio, assim como a quantidade relativa de cavidades.

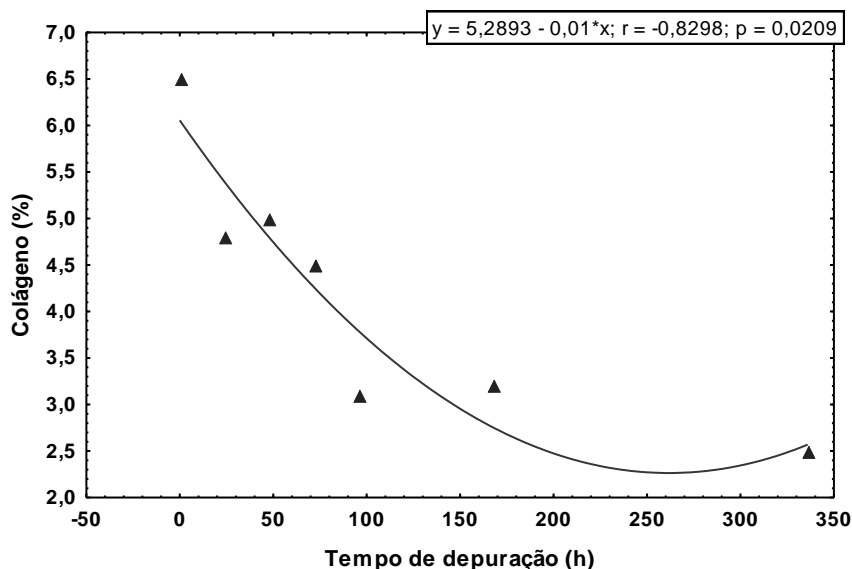


Figura 5.44 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração.

Segundo Silva (2010), a esponja *Hymeniacidon heliophila* possui o mesoílo denso, com pouca quantidade de fibras de espongina circundando as espículas de sílica. Desta forma, as maiores concentrações de Mn, Ni, Cd, Pb, Cr e Zn encontradas em *H. heliophila* no trabalho deste autor, podem estar relacionadas à presença de uma maior quantidade de colágeno. No presente estudo, a quantidade de colágeno diminuiu ao longo do experimento, assim como a concentração de HPAs, mas não há correlação entre estes dois parâmetros.

A Figura 5.45 mostra como o colágeno é contabilizado. O software ImageJ apenas faz a contagem dos pontos vermelhos que representam o colágeno e como e de que maneira este está distribuído e concentrado no tecido. A quantidade de colágeno e as mudanças na estrutura tecidual das esponjas ao longo do ensaio de depuração são mostradas na Figura 5.46. Pode ser verificada que o colágeno está perfeitamente concentrado nas bordas do tecido e ao redor dos canais aquíferos no T0. O colágeno se concentrou mais internamente no tecido, com a desorganização das cavidades e conseqüente rompimento dos canais aquíferos, ao decorrer do bioensaio de depuração.

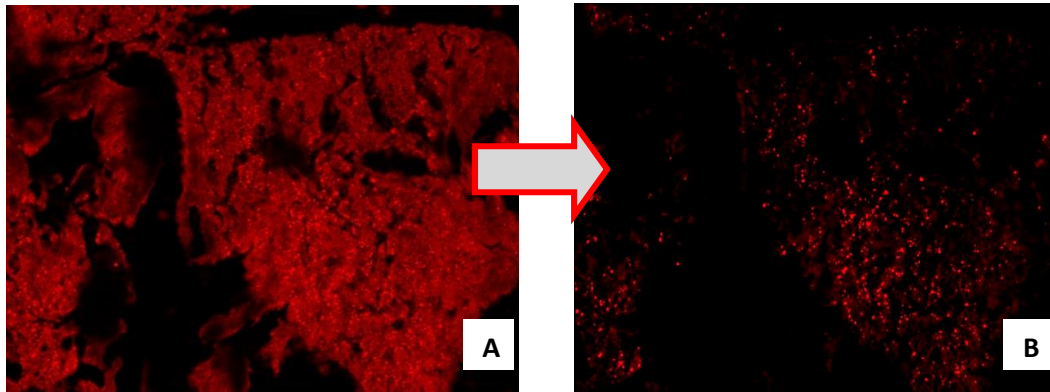


Figura 5.45 Demonstração da estrutura do tecido da esponja (A) e dos pontos vermelhos representados pelo colágeno (B).

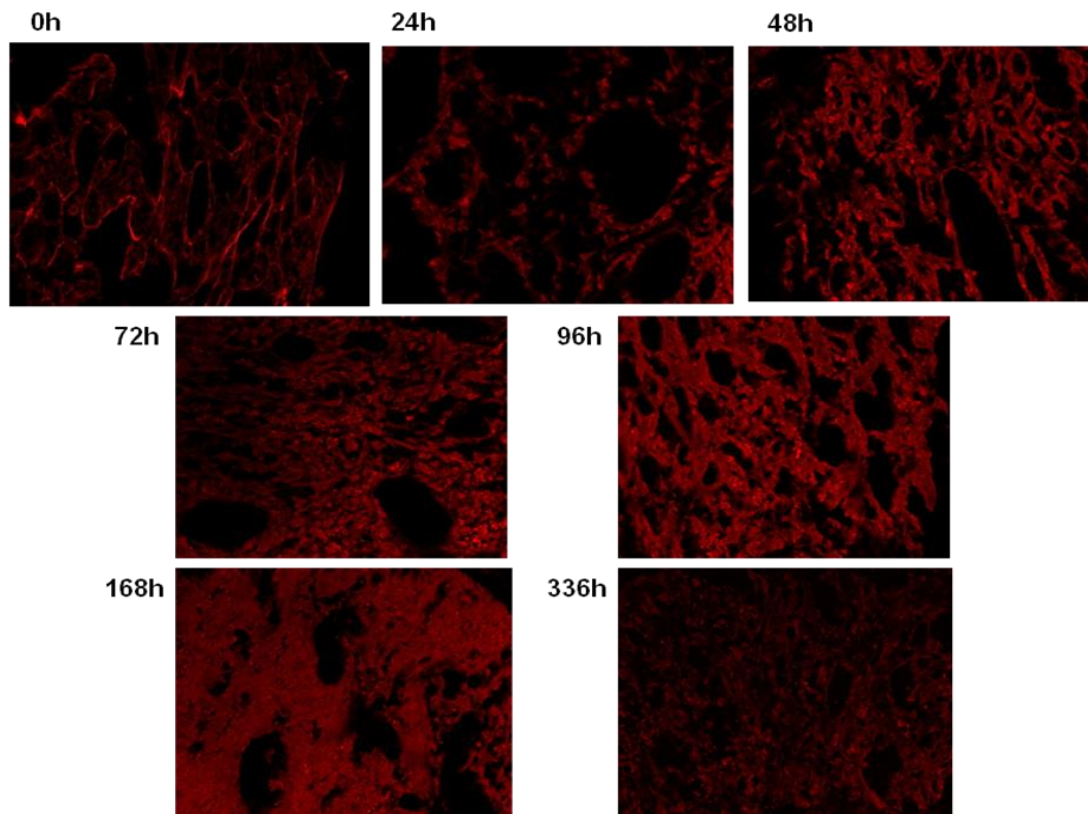


Figura 5.46 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração mudanças na estrutura tecidual da esponja.

A proteína colágeno decresceu durante o bioensaio de acumulação. De acordo com o gráfico (5.47), possivelmente poderia ter tido uma degradação de colágeno, mas na Figura 5.48 há menos colágeno organizadamente envolvendo os canais aquíferos no último tempo de experimento em relação ao primeiro. Isto

corrobora a hipótese de processo de contração com desorganização dos canais aquíferos e formação de cavidades largas.

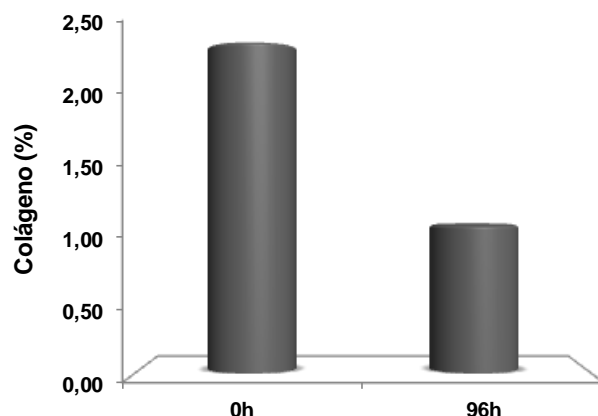


Figura 5.47 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de acumulação.

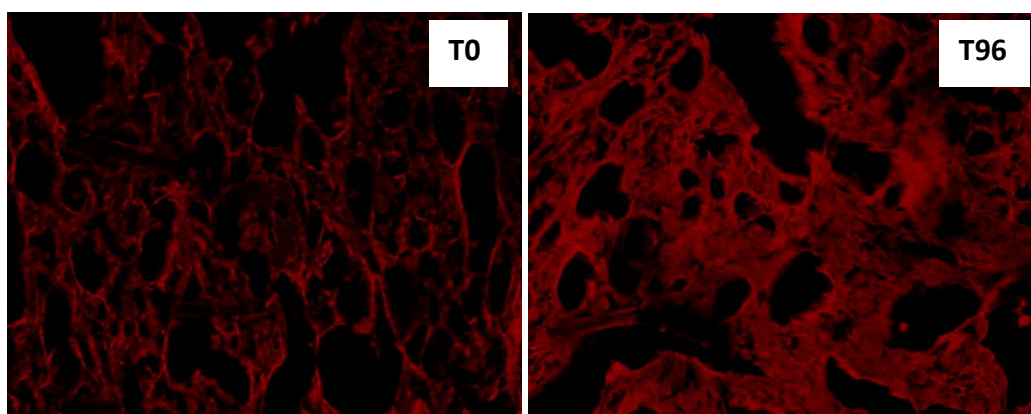


Figura 5.48 Redução do colágeno em tecido da esponja com tempo de depuração mudanças na estrutura tecidual da esponja.

No T0, a distribuição do colágeno encontrou-se perfeitamente concentrada ao redor dos canais aquíferos e das câmaras coanocitárias. Ao passar do tempo, conforme a contração foi progredindo, o colágeno foi se dispersando e a diminuição significativa de câmaras coanocitárias pode ter sido em consequência da dispersão do colágeno ou pode ter acontecido em função contrária, mas pode-se dizer que há uma relação entre essas estruturas.

O resultado dos cortes histológicos relativos ao ensaio de acumulação não apresentaram alterações significativas comparáveis àquelas encontradas nas análises histológicas do ensaio de depuração. Provavelmente, se o ensaio de

acumulação tivesse a mesma duração que o de depuração, maiores efeitos seriam conferidos.

A variação da concentração dos HPAs não mostrou relação com os biomarcadores histológicos nos dois bioensaios. As esponjas são organismos com grande atividade microbiana, características celulares peculiares, um intricado metabolismo secundário (Vogel, 1977; Ribeiro *et al.*, 2010), que somados à estrutura tecidual, podem resultar em elevada complexidade para entender os processos que ocorrem na esponja e relacioná-los à contaminação química.

5.3. Comparação entre os biomonitoramentos

As concentrações na água de Itaipu foram muito elevadas em relação às amostras coletadas no mesmo lugar, mas em épocas diferentes. Esta diferença pode ser interpretada, possivelmente, como uma influência do tempo no dia da coleta. Quando a amostragem foi realizada em dezembro de 2012, pancadas de chuva ocorreram durante a semana e o mar estava agitado por conta disto, podendo ter alterado na concentração dos HPAs na água. Além disso, pode ter havido uma contribuição das águas da Baía de Guanabara, durante a vazante destas, pois no dia da coleta, uma corrente Sul-Sudoeste, que é a corrente que sai da baía, entrou para a região de Itaipu, enquanto no dia da amostragem em fevereiro de 2011, a corrente era de Leste, ou seja, não tinha influência das águas da Baía de Guanabara. Na Urca, as amostras de água coletadas em 2012 apresentaram concentrações maiores dos 16HPAs e menores dos totais, quando comparadas às amostras coletadas em 2011. Esta diferença na Urca pode ser explicada, possivelmente, pela influência do tempo no dia da coleta. Quando a amostragem foi realizada em maio de 2012, havia chovido bastante durante a semana, podendo ter alterado a concentração dos HPAs na água. A diferença pequena entre os somatórios dos 38 HPAs das amostras da Urca decorreu da diminuição dos alquilados, juntamente com o aumento dos leves na amostra do último ano, comparada com a do ano anterior (Figura 5.49). A série alquilada do fluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno, pireno e criseno foram considerados para calcular a soma dos HPAs alquilados.

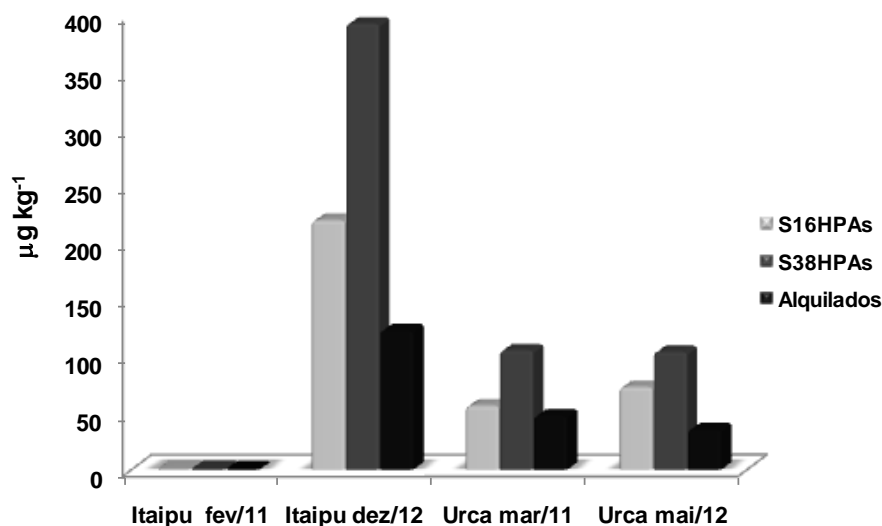


Figura 5.49 Distribuição dos HPAs em água entre os meses de coleta.

As concentrações dos HPAs em esponjas coletadas na Urca foram superiores às concentrações nas esponjas procedentes de Itaipu (Figura 5.50). As esponjas coletadas em Itaipu, em fevereiro de 2011, apresentaram maior média dos 16 HPAs prioritários em relação à amostra de indivíduo diferente (T0), coletada no mesmo local, em dezembro de 2012, para o ensaio de acumulação. Porém, a concentração dos HPAs totais não seguiu essa distribuição, ou seja, os níveis destes são maiores na amostra coletada para o bioensaio de acumulação. Logo, houve uma maior contribuição por parte dos HPAs que não são considerados prioritários, constituídos na sua maior parte, de homólogos alquilados. Inversamente a estes fatos, na Urca, as esponjas coletadas para o biomonitoramento passivo apresentaram concentrações menores dos 16HPAs e maiores dos totais, quando comparadas às amostras coletadas para a realização do bioensaio de depuração. O aumento e o decréscimo dos 38 HPAs decorrem de variações nos compostos alquilados. A série alquilada do fluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno, pireno e criseno foram considerados para calcular a soma dos alquilados. As diferenças entre as concentrações dos HPAs totais entre os locais de amostragem em ambos os biomonitoramentos são ilustradas na Figura 5.51.

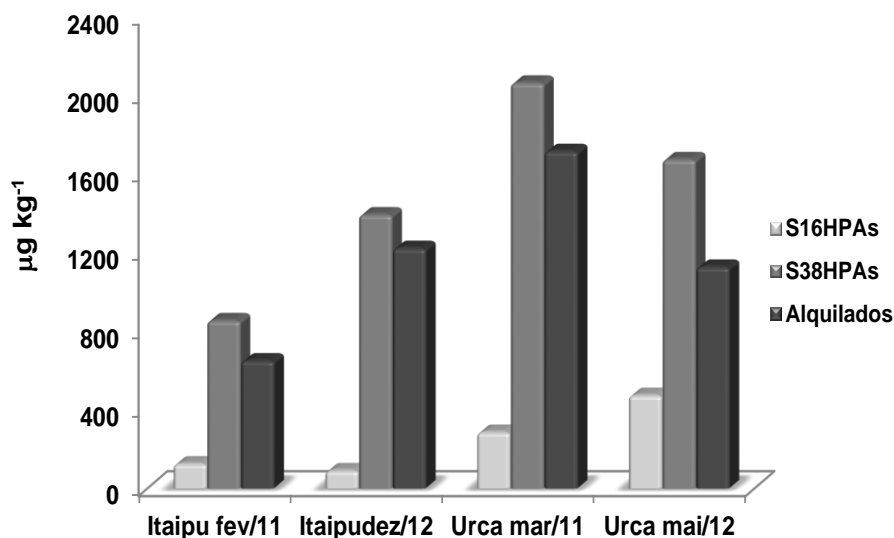


Figura 5.50 Distribuição dos HPAs em tecido de esponja entre os meses de coleta para os biomonitoramentos passivo e ativo.

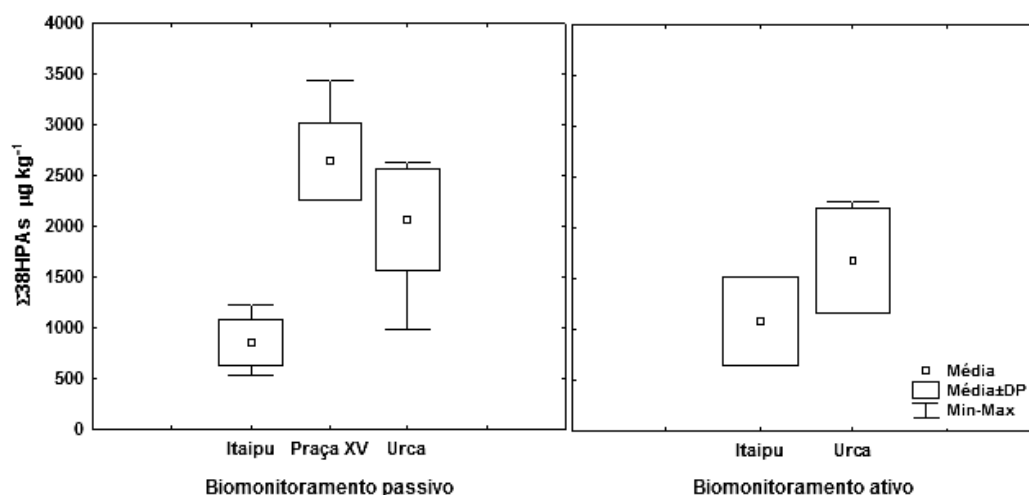


Figura 5.51 Distribuição dos HPAs em tecido de esponja entre os meses de coleta para os biomonitoramentos passivo e ativo.

A diferença no perfil dos HPAs em amostras de campo (T0), coletadas para o bioensaios de depuração, na Urca, e para o de acumulação, em Itaipu, é apresentada na Figura 5.52. As concentrações dos HPAs leves (2 a 3 anéis) são maiores em Itaipu, enquanto os HPAs pesados (4 a 6 anéis) são mais representativos nas amostras coletadas na Urca. Os alquilados do fenantreno (C2Fe a C4Fe) apresentaram concentrações superiores aos demais HPAs nas amostras procedentes da Urca, principalmente o C3Fe.

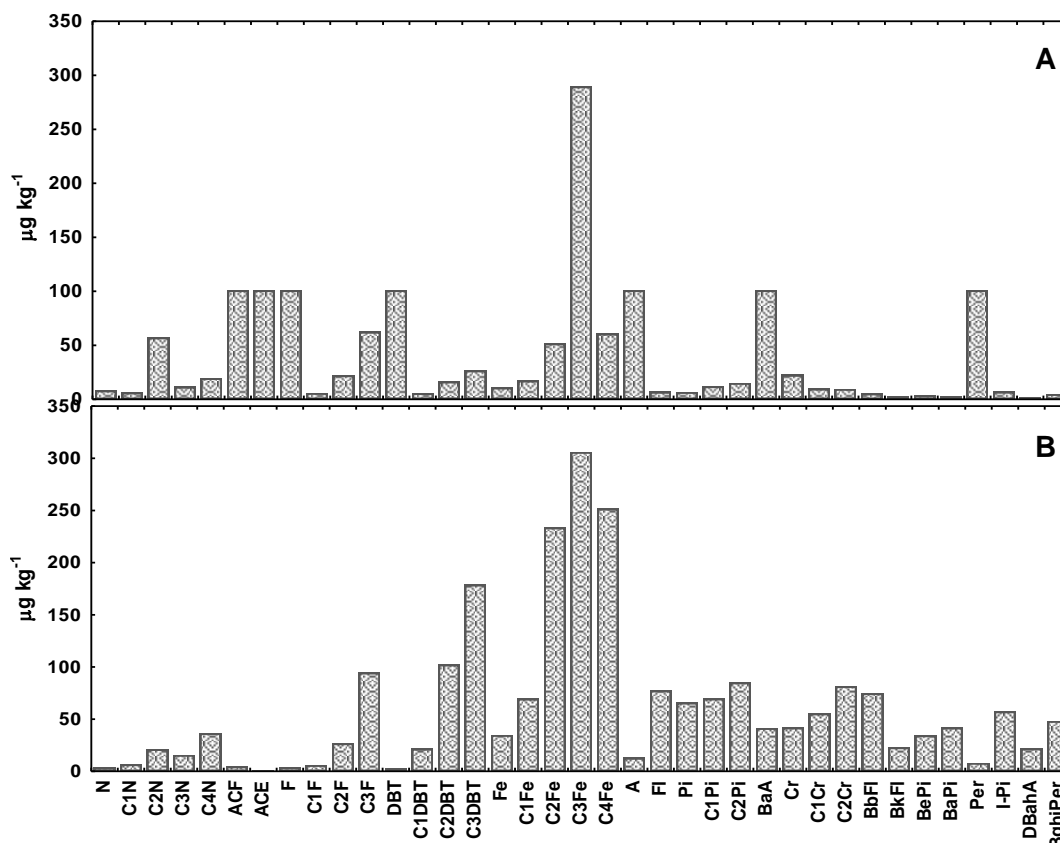


Figura 5.52 Tipologia dos HPAs em esponjas em T0, coletadas em Itaipu (A) e Urca (B), para os bioensaios de acumulação e depuração, respectivamente.

Avaliou-se o fator de acumulação para averiguar a capacidade das esponjas de acumularem os HPAs e nível de incorporação destes compostos. A partição dos compostos hidrofóbicos entre a forma particulada e dissolvida é influenciada pela solubilidade em água, assim a distribuição dos compostos entre a água e material particulado é diferente para os vários HPAs, como já descrito anteriormente. Os HPAs possuem propriedades físico-químicas distintas e uma das mais importantes é a solubilidade em água, que é diferente para cada HPA, determinando o destino deste no ambiente na partição água-particulado. O fator de acumulação (FA) é a razão da concentração do composto presente no tecido de esponja sobre a concentração do mesmo composto presente na matriz principal de incorporação dos HPAs, como no caso deste estudo, usou-se os valores reportados para água e material particulado.

$$FA = \frac{C_{biota}}{C_{\text{água ou MP}}} \quad (5.1)$$

Onde:

FA – fator de acumulação

C_{biota} – concentração de HPAs na biota

$C_{\text{água}}$ – concentração de HPAs na água ou material particulado

Os fatores de acumulação (FA) foram calculados para HPAs individuais, para os somatórios dos HPAs prioritários ($\sum 16$ HPAs) e para o somatório de todos os compostos ($\sum 38$ HPAs) em amostras da esponja *Hymeniacidon heliophila* do biomonitoramento passivo e para o bioensaio de depuração (T0). Para o bioensaio de acumulação (T0), o FA foi apenas calculado para o criseno (T0). O fator de acumulação em função das amostras de filtro foi calculado apenas para o biomonitoramento ativo. As médias dos somatórios estão reportadas na Tabela 5.5.

Tabela 0.5 Média do fator de acumulação em tecido da esponja *Hymeniacidon heliophila* dos biomonitoramento passivo e ativo.

Biomonitoramento passivo			Bioensaio de depuração	
	Praça XV	Urca		T0
16HPAs	86	5	16HPAs	7
			38HPAs	16
38HPAs	155	20	16HPAs	4
			(filtro)	
			38HPAs	
			(filtro)	6
Bioensaio de acumulação				
	T0	T24		T96
Criseno	1,6	4,9		6,1
	1,8 (filtro)	-		-

No biomonitoramento passivo, os fatores de acumulação calculados, tanto para $\sum 16$ HPAs quanto para $\sum 38$ HPAs, das amostras da Praça XV foram maiores que aqueles obtidos nas amostras da Urca, por conta das concentrações menores

de HPAs encontrados na água deste local. A Figura 5.53 ilustra a variação do fator de acumulação entre os HPAs. Pode ser verificado que a acumulação ocorreu, na sua grande maioria, representada por compostos pesados (4-6 anéis).

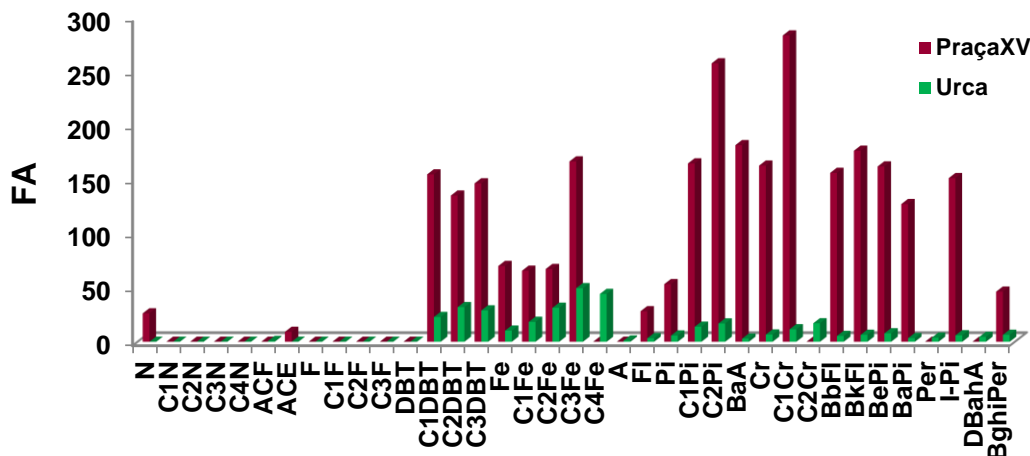


Figura 5.53 Fator de acumulação em esponja do biomonitoramento passivo.

No biomonitoramento ativo, o fator de acumulação verificado em função das amostras de água oriundas da Urca foi maior, tanto para $\sum 16$ HPAs quanto para $\sum 38$ HPAs, que aquele calculado em função das amostras de filtro. O FA calculado para os HPAs analisados em amostra de filtro obteve valores cerca de duas vezes menor, indicando a água como a principal matriz pela qual as esponjas incorporam estes contaminantes. Entretanto, as esponjas de Itaipu (T0), coletadas para o bioensaio de acumulação, apresentaram valor de FA medido pelo filtro superior ao FA pela água, sugerindo que os HPAs adsorvidos nas partículas são os principais contribuintes na acumulação. Outro aspecto interessante é que a diferença entre FA do $\sum 16$ HPAs e do $\sum 38$ HPAs no filtro é pequena, implicando em grande acumulação dos HPAs prioritários e parentais, já que os HPAs totais são constituídos, em sua maioria, por compostos alquilados.

A Fig 5.54 mostra a variação do fator de acumulação entre os HPAs. O FA calculado em função da água apresentou valores elevados em comparação com o FA obtido pelo filtro, devido às concentrações menores encontradas na água da Urca. Pode ser verificado que a acumulação nas esponjas ocorreu através do material particulado por compostos pesados (4-6 anéis). Enquanto a acumulação pela água, os HPAs leves (2-3 anéis) e os compostos alquilados predominaram.

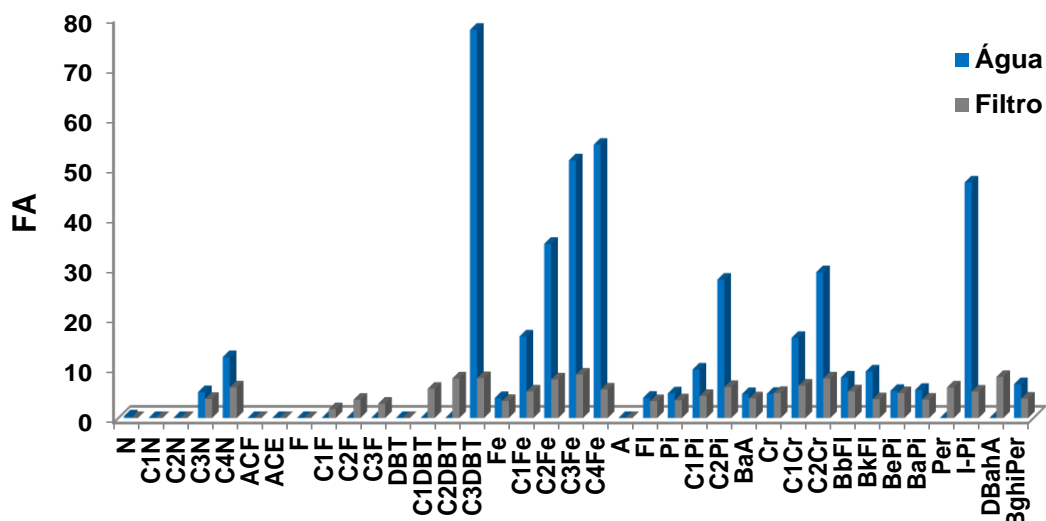


Figura 5.54 Fator de acumulação em esponja do biomonitoramento ativo (T0-Urca).

Durante o bioensaio de exposição ao criseno, o fator de acumulação deste HPA nas esponjas aumentou significativamente, triplicando nas primeiras 24 horas, enquanto o fator de acumulação cresceu 1,5 vezes entre T24 e T96, (Figura 5.55). O teor de lipídios cresceu gradativamente ao longo do bioensaio e decresceu no último tempo de exposição. Entretanto, o teor lipídico não aumentou durante as primeiras 24 h para ter um fator de acumulação alto e consequente acumulação rápida do criseno, sugerindo um questionamento da possível relação entre o teor de lipídio e a concentração de HPAs acumulada no tecido. Com o nível de glutathione (GSH), que atua como proteção da célula, muito baixo em T24, em comparação com T0, provavelmente ocasionou em um intenso acúmulo do criseno em T24. Os valores dos HPAs individuais das amostras de água dos aquários para calcular o fator de acumulação do criseno estão reportados no Anexo XV.

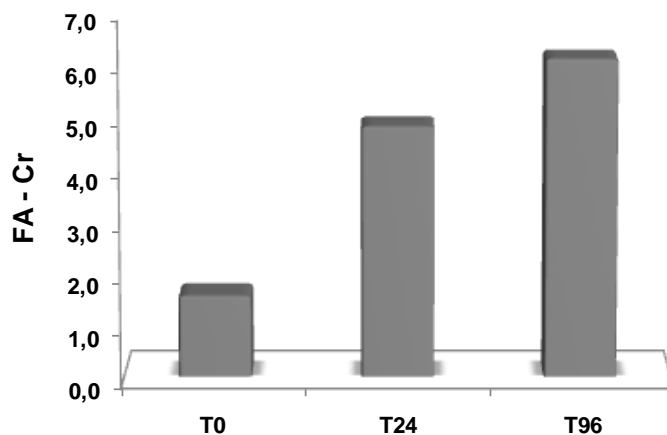


Figura 5.55 Fator de acumulação em tecido de esponja durante exposição ao crisco.

O coeficiente octanol-água (K_{OW}) simula a partição dos compostos entre água e os lipídios bióticos, caracterizando a tendência de uma molécula se acumular nas membranas biológicas nos organismos vivos, havendo uma elevada correlação entre o $\log K_{OW}$ e o fator de bioconcentração (Neff, 1979).

Segundo Neff (2002), a bioconcentração de HPAs através da água pelos organismos marinhos é diretamente proporcional aos respectivos valores do coeficiente de partição *n*-octanol-água (K_{OW}), cujo log para HPAs estão presentes numa faixa entre 3,3 e 7,0 e é proporcional ao peso molecular. Portanto a razão $FBC/\log K_{OW}$ também cresce conforme o aumento da massa molecular (Neff, 2002). Além disso, muitos fatores (bióticos e físicos) afetam a relação FBC/K_{OW} . Fatores bióticos incluem metabolismo ativo e excreção do agente químico, a espécie, o teor de lipídios e distribuição no animal (que depende da idade, sexo e fase do ciclo reprodutivo), estado de alimentação e taxa metabólica do animal (que varia com a espécie, idade e estado nutricional do animal). Enquanto que os fatores físicos que afetam a relação entre o FBC e K_{OW} incluem a temperatura, a salinidade, e a forma física dos agentes químicos na água ou sedimentos (Meador *et al.*, 1995).

A razão FA/K_{OW} para amostras do biomonitoramento passivo foi maior para os compostos mais pesados (4-6 anéis) nas amostras procedentes da Praça XV (Figura 5.56). Na Urca, a razão não variou entre os HPAs prioritários por conta dos baixos valores de FA calculados. Enquanto nas amostras de campo,

destinadas ao bioensaio de depuração, a razão FA/ K_{OW} foi maior em amostras de água e para compostos de alto peso molecular (Figura 5.57).

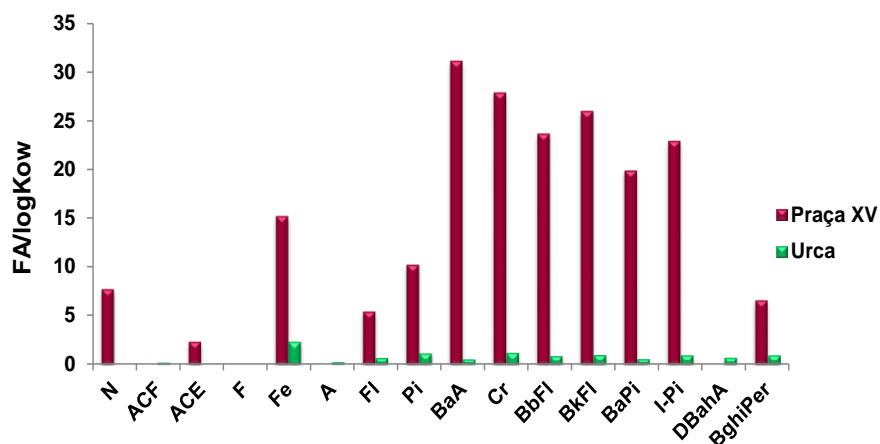


Figura 5.56 Razão FA/log K_{OW} para HPAs prioritários em amostras do biomonitoramento passivo.

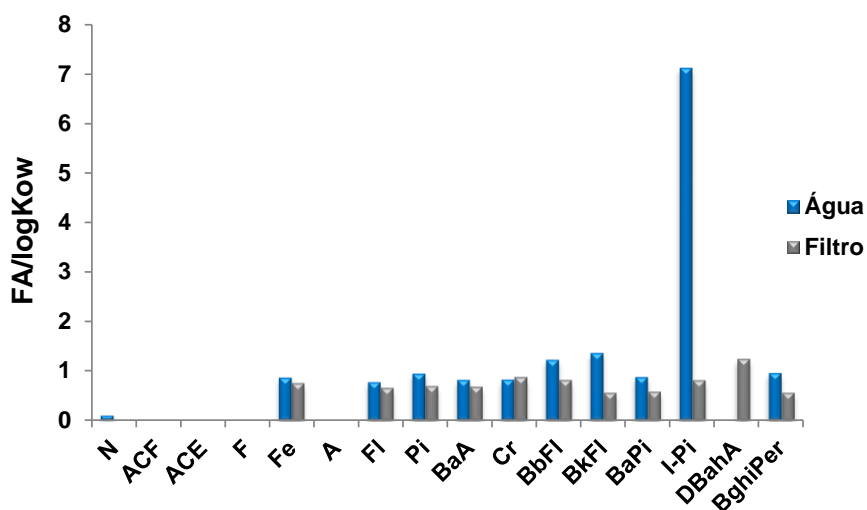


Figura 5.57 Razão FA/log K_{OW} para HPAs prioritários em esponjas (T0) do bioensaio de depuração.

Modelos de bioacumulação geralmente assumem que tanto a taxa de absorção constante (k_1) e a constante da taxa de eliminação (k_2) estão diretamente correlacionados com K_{OW} . Eliminação passiva através de particionamento de equilíbrio pode ser rápida para HPAs de baixo peso molecular, mas é muito lenta para compostos de alto peso molecular com alto K_{OW} e solubilidade aquosa baixa (Meador *et al.*, 1995).

A avaliação de fontes de contaminação nas amostras de tecido de esponja, de água e de filtro foi realizada, usando razões diagnósticas de origem. Existe um vasto número de razões tendo como base os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) individuais e são utilizados, principalmente com diagramas *bi-plot*, como $Fl/(Fl+Pi)$ e $BFl/(BFl+BePi)$, para avaliar a contribuição relativa de HPAs petrogênicos e/ou pirogênicos nos ambientes, determinando, assim, a origem destes compostos. Além disso, o uso de razões diagnósticas possibilita a avaliação do tipo de material queimado, como óleo, diesel, carvão, biomassa, etc. (Wang *et al.*, 1999; Yunker *et al.*, 2002). Entretanto, há incertezas inerentes à aplicação desses índices em amostras ambientais, geradas por alguns fatores, como temperatura de combustão, degradação diferenciada dos HPAs e a presença de materiais e óleos provenientes de diversas fontes no ambiente, que podem influenciar na assinatura original de fontes específicas de HPAs (Wang *et al.*, 1999).

No biomonitoramento ativo (Figura 5.58), apesar de não ter sido obtida forte correlação entre os grupos de HPAs, como aconteceu no biomonitoramento passivo, a correlação foi significativa ($p < 0,05$). As esponjas coletadas em Itaipu apresentaram tendência de contaminação por fonte petrogênica, em contraste com as amostras de água. Isto pode ser explicado pelo local de fixação das esponjas, que se situa na zona entremarés, facilitando a filtração de água superficial, onde se encontra o filme de óleo. Uma das amostras de esponja da Urca mostra este perfil e as outras estão próximas deste limiar. Este fato também ocorreu no estudo de Francioni *et al.* (2007), no qual foram relatadas concentrações de HPAs petrogênicos no mexilhão *Perna perna* e foram atribuídas à filtração da água superficial, contendo filme de óleo.

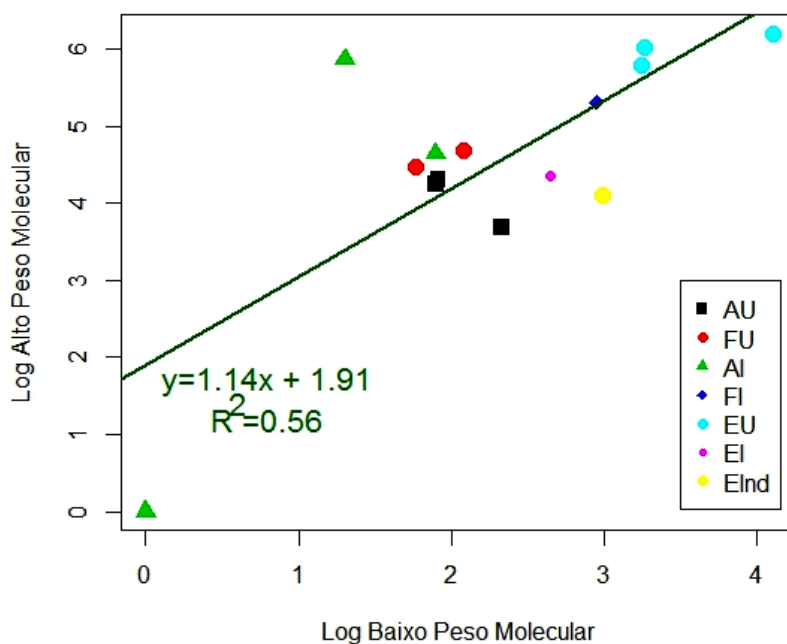


Figura 5.58 Log-log plot da soma dos HPAs de alto e baixo peso molecular. AU – água Urca; FU – filtro Urca; AI – água Itaipu; FI – Filtro Itaipu; EI – esponja Itaipu; EU – esponja Urca; EI – esponja Itaipu; EInd – esponja Itaipu mesmo indivíduo.

Os gráficos tipo *cross-plots* foram feitos para avaliar o tipo de material e determinar possível fonte das amostras, sendo ela pirogênica, petrogênica ou mistura de ambas as fontes (Figura 5.59). A maioria das amostras dos dois tipos de biomonitoramento apresentou uma distribuição característica de fontes de combustão de vegetação, madeira e carvão. Entretanto, este resultado não é condizente com os locais de amostragem, como por exemplo, as amostras provenientes da Praça XV indicaram o tipo de combustão citado. Este local não possui características para estar sujeito a este tipo de fonte predominante, já que existem muitas embarcações e encontra-se próximo ao porto do Rio de Janeiro. Esta contradição é descrita em um estudo recente (Wagener *et al.*, 2012), no qual razões diagnósticas das amostras de sedimento de áreas altamente industrializadas da Baía de Guanabara e do porto mostraram combustão como fonte principal, com contribuição de HPAs pirogênicos, mesmo naquelas amostras que possuem concentrações relativamente altas de alquilados de naftaleno e outros homólogos alquilados; tais razões não revelaram mistura de fontes. Outro problema relacionado ao uso de razões diagnósticas para determinação de fontes dos HPAs

é sua aplicabilidade em organismos marinhos. Para tal, a taxa de incorporação dos HPAs que compõe cada razão tem que ser a mesma. Os organismos podem incorporar preferencialmente um determinado HPA em detrimento de outro também utilizado em uma determinada razão diagnóstica de fonte. As esponjas são organismos filtradores que incorporam partículas, nas quais estão adsorvidos principalmente os HPAs pesados. E, como já discutido anteriormente, algumas amostras de esponja possuem uma maior quantidade relativa de HPAs leves por estarem fixadas na região entremarés, filtrando água superficial que contém filme de óleo. Logo, é questionável o uso das razões de origem dos HPAs em esponjas, por conta da mistura de fontes que estes organismos podem estar expostos.

Não foi possível calcular algumas razões diagnósticas, pois em certas amostras, tanto de biota, quanto de água, alguns compostos ficaram abaixo do limite de detecção e outras são caracterizadas apenas pelos alquilados.

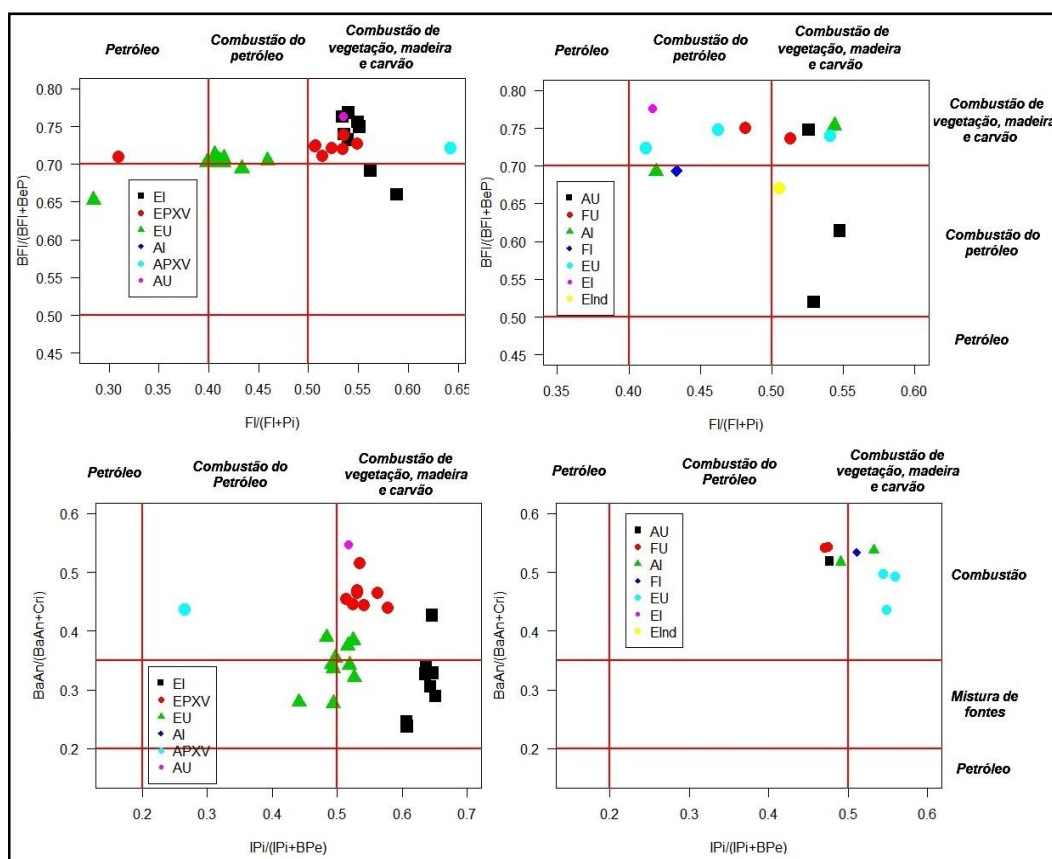


Figura 5.59 Cross-plots das razões diagnósticas aplicadas nas amostras dos biomonitoramentos. E- esponja (I – Itaipu, PXV – Praça XV, U – Urca, Ind – mesmo indivíduo); A - água (I – Itaipu, PXV – Praça XV, U – Urca); F – filtro (I – Itaipu, U – Urca).

6 Conclusões

O presente estudo demonstrou o potencial de se utilizar esponjas da espécie *Hymeniacidon heliophila* em monitoramentos ambientais de sistemas estuarinos. Os resultados dos bioensaios e estudos de campo, provaram que estes organismos podem mostrar a atual situação do ambiente e dos impactos causados nos mesmos, assim como as relações dos efeitos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

No biomonitoramento passivo, todas as amostras mostraram alta proporção relativa de compostos alquilados e os níveis da concentração destes apresentaram-se na seguinte ordem: Praça XV < Itaipu < Urca. As concentrações dos HPAs nos tecidos aumentaram razoavelmente na Praça XV e significativamente nas amostras de Itaipu, quando comparadas com as amostras analisadas por Fontes (2011). Enquanto os níveis dos HPAs diminuíram na Urca. A quantidade relativa de alquilados em Itaipu no presente estudo, contribuiu para que houvesse uma maior influência petrogênica em relação ao ano anterior, possivelmente, devido às condições ambientais e da presença de fontes descontínuas que podem alterar a distribuição dos HPAs. A contínua influência pirogênica na Praça XV não condiz com as características do local, pela diversidade de entradas de HPAs petrogênicos no ambiente, que são mais intensas que o fluxo de material pirogênico, proveniente de fluxo de veículos e despejo de efluentes domésticos.

Com o biomonitoramento ativo, foi possível verificar as taxas de incorporação e depuração e avaliar a capacidade da esponja de responder aos possíveis efeitos causados pelos HPAs. No bioensaio de depuração, a eliminação foi gradativa nas primeiras 96 horas de experimento e foi mais significativa a partir do tempo de 168h. Essa redução foi verificada principalmente para os HPAs totais, sendo bastante atenuada nos últimos tempos. No bioensaio de exposição, a acumulação do criseno foi rápida e intensa nas primeiras 24 horas e depois tornou-se gradativa. A taxa de acumulação foi relativamente alta em comparação com a

taxa de depuração. A concentração deste HPA em tecido do mesmo indivíduo resultou na metade da concentração encontrada em indivíduos diferentes. Isto pode ter acontecido pelo fato do mesmo indivíduo gastar energia para reparar os canais aquíferos destruídos com a retirada de parte do tecido para a análise dos HPAs, ocorrendo a possível paralisação parcial da filtração.

O uso dos biomarcadores possibilitou a verificação da magnitude da contaminação por HPAs e a avaliação da resposta imediata frente à exposição destes compostos no ambiente e em laboratório. Nenhuma alteração foi verificada referente ao tempo de retenção do vermelho neutro (TR-VN) e da expressão da glutathiona (GSH) durante o bioensaio de depuração. O TR-VN diminuiu conforme a acumulação do criseno no tecido, sugerindo como consequência do efeito deste HPA nas células. O ensaio do vermelho neutro obteve melhor resultado no mesmo indivíduo no ensaio de acumulação, devido à menor variação da resposta. Enquanto a glutathiona apresentou melhores resultados em diferentes indivíduos. O crescimento gradativo dos níveis de GSH durante a acumulação refletiu o decréscimo na concentração do criseno no último tempo de experimento, ou seja, foi necessário um determinado limite mínimo de produção de GSH para que a depuração fosse superior a acumulação. Isto revela que a esponja foi capaz de tolerar altas concentrações do criseno e a conjugação da GSH com este HPA permitiu sua eliminação. Não foi obtido êxito com o ensaio do micronúcleo devido à alta associação das células. As células foram extraídas com sucesso e as lâminas foram muito bem confeccionadas, porém a alta densidade das células e a falta de dissociação das mesmas fizeram com que não fosse possível identificar com precisão os micronúcleos. Novos testes serão conduzidos para aperfeiçoar a dissociação celular. Os biomarcadores histológicos podem ser considerados para a avaliação da saúde de esponjas em bioensaios, pois não houve correlação com a concentração dos HPAs, apenas com o tempo do experimento. Tanto no ensaio de depuração quanto no de acumulação, a desorganização celular foi conferida, em consequência da contração da parede dos tecidos. Muitas das cavidades foram rompidas e com isso o colágeno se dispersou para o interior do tecido, sugerindo uma forte associação desta proteína com as câmaras coanocitárias.

A esponja *Hymeniacidon heliophila* se mostrou uma excelente monitora de HPAS por ser resistente a altas concentrações do criseno e por também revelar efeitos imediatos em função da exposição a estes xenobióticos. Além disso, esta

espécie apresentou grande capacidade de acumular rapidamente e eliminar HPAs, apesar da depuração ter sido lenta, foi significativa em longo prazo, apresentando-se apta como biomonitora de HPAs.

Novos bioensaios serão conduzidos com maior cautela a fim de aprimorar os biomarcadores e obter melhor acompanhamento da dinâmica de depuração e acumulação, medindo níveis dos HPAs na água diariamente e adquirindo aquário controle para melhor comparação entre os biomarcadores. Testes para verificar volatilização dos HPAs serão novamente realizados, adquirindo um meio de avaliar a concentração diária do HPA dissolvido no aquário.

AAS, E., *et al.* Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. **Marine Environmental Research**, 52: 213-229, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5.ed. New York: Garland Science, 2007. 1392 p.

ALCOLADO, P.M. Reading the code of coral reef sponge community composition and structure for environmental biomonitoring: some experiences from Cuba. In: CUSTÓDIO, M.R.; LÔBO-HAJDU, G., HAJDU, E.; MURICY, G. (Eds.) **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. Série Livros, n. 28, p. 3-10.

ALCUTT, F.; J.T., PINTO. Glutathione concentrations in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following laboratory exposure to lead (a potential model system for evaluating exposure to carcinogens and toxins). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, 107: 347-352, 1994.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, 343: 121-135, 1995.

AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Estudos de Laboratório e Monitoramento em Campo**. Curitiba, 2003. 111p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

AMADOR, E. Assoreamento da Baía de Guanabara - Taxas de Sedimentação. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 4 (52): 723-742, 1980.

AMADOR, E. **Baía de Guanabara e ecossistemas periféricos: homem e natureza**. Rio de Janeiro: Reproarte Gráfica e Editora Ltda., 1997. 539 p.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for chrysene**. Atlanta: Clement Assoc, Inc. Publication No. ATSDR/TP-88/11, 1990.

AZEVEDO, L.A.C. **Determinação de Hidrocarbonetos em Amostras de Água e Mexilhões da Baía de Guanabara**. Rio de Janeiro, 1998. 141p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

BACHINSKI, N. *et al.* Immediate early response of the marine sponge *Suberites domuncula* to heat stress: reduction of trehalose and glutathione concentrations and glutathione S-transferase activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 210: 129-141, 1997.

BAIRD, C; CANN, M. **Environmental Chemistry**. 5.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012. 736 p.

BAUMARD, P. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. **Marine Environmental Research**, 47: 415-439, 1999.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas de histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976. 241 p.

BERLINCK, R.G.S. *et al.* Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil, **Journal of Natural Products**, 67: 510-522, 2004.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 61: 882-888, 1963.

BIHARI, N.; FAFANDEL, M.; PISKUR, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galliprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 52: 379-387, 2007.

BOEHM, P. D. Aspects of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Geochemistry of Recent Sediments in the Georges Bank Region. **Environmental Science & Technology**, 18 (11): 840-845, 1984.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, 24: 119-124, 1985.

BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). **Oceanologica Acta**, 16 (2):145-161, 1993.

BREVES-RAMOS, A. *et al.* Succession in rocky intertidal benthic communities in areas with different pollution levels at Guanabara Bay (RJ-Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48 (6): 951-965, 2005.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. Phylum Porifera: the sponges. In: _____. **Invertebrates**. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2003. cap. 6, p. 179-208.

CARREIRA, R.S. **Investigação sobre o acréscimo da estocagem de carbono em ambientes fertilizados pela ação antropogênica: a Baía de Guanabara como modelo**. Rio de Janeiro, 2000. 200p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

CASINI, S. *et al.* Use of biomarkers to investigate toxicological effects of produced water treated with conventional and innovative methods. **Marine Environmental Research**, 62: 347–351, 2006.

CEBRIAN, E. *et al.* Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: Metal accumulation and biological responses. **Marine Pollution Bulletin**, 46: 1273–1284, 2003.

CERNIGLIA, C.E.; HEITKAMP, M.A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Ed.). **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment**. Boca Raton: CRC Press, 1989. cap. 2, 41–68.

CONAMA Nº 357/2005 - "Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências."- Data da legislação: 17/03/2005 - Publicação DOU: 18/03/2005.

COSTA, A.O. da. **Poluição por óleo na Baía de Guanabara: o caso do complexo industrial REDUC-DTSE**. Rio de Janeiro, 2003. 156p. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – COPPE – Programa de Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

COSTA, R.C. *et al.* 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 31 (7): 1820-1830.

DENTON, G.R.W. *et al.* **Heavy metals, PCBs and PAHs in marine organisms from four harbour locations on Guam**. Water and Environmental Research Institute of the Western Pacific, University of Guam Mangilao, Relatório técnico n. 87, 1999. 158 p.

DENTON, G.R.W. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in small island coastal environments: A case study from harbours in Guam, Micronesia. **Marine Pollution Bulletin**, 52: 1090-1117, 2006.

DIAZ, M. C.; RUTZLER, K. Sponges: an essential component of Caribbean coral reefs. **Bulletin of Marine Science**, 69: 535–546, 2001.

DOLBER, P.; SPACH, M. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 41: 465-469, 1993.

DORNFELD, C.B. **Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP).** São Paulo, 2002. 196p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

EFREMOVA, S.M. Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and waste water from Baikalsk Pulp and Paper Plant. **Aquatic Toxicology**, 57: 267-280, 2002.

ELIAS, C. *et al.* Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, 6: 1-9, 2006.

EPA – U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3510C – Separatory funnel liquid-liquid extraction. In: **Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/>>. Acesso em 15 mar. 2010.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3540C - Soxhlet extraction. In: **Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/>>. Acesso em 15 março 2010.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 8270C – Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). In: **Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/>>. Acesso em 15 março 2010.

EXPOSITO, J.Y. *et al.* Short Chain Collagens in Sponges Are Encoded by a Family of Closely Related Genes. **The Journal of Biological Chemistry**, 266 (32): 21923-21928, 2001.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95, 2000.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, 140-141: 353-365, 2003.

FIELD, J.A.; THURMAN, E.M. Glutathione conjugation and contaminant transformation, **Environmental of Science and Technology**, 30: 1413–1418, 1996.

FILLMANN, G. **Appraisal and validation of rapid, integrated chemical and biological assays of environmental quality**. Plymouth, 2001. 170p. Tese (Doutorado em Ciências do Mar) - Faculty of Science, University of Plymouth.

FINGAS, M. Oil Spills: Why do they happen and how often? In:_____. **The Basics of Oil Spill Clean up**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. cap. 1, p. 1-17.

FONSECA, S.M. **Valoração Econômica-Ecológica de um Ecossistema Costeiro Tropical, através da disposição ao trabalho voluntário**. Niterói, 2001, 114p. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Instituto de Geociências - Departamento de Análise Agroambiental, Universidade Federal Fluminense.

FONTES, K.T. **Estudo sobre a concentração e tipologia de HPAs em esponja marinha (*Hymeniacidon heliophila*) e comparação com a acumulação em *Perna perna***. Rio de Janeiro, 2011. 165p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

FOSSI, M.C., *et al.* Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. **Chemosphere**, 40: 861-874. 2000.

FRANCIONI, E. *et al.* Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin**, 54: 329-338, 2007.

GESAMP – Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. **Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment**. London: International Maritime Organization. Gesamp Reports and Studies, n. 50, 1993. 180 p.

GLYZINA, O.Y. *et al.* Study of mutual influence of polycyclic aromatic hydrocarbons (anthracene, pyrene) and Baikalian sponges in model experiments. **Chemistry for Sustainable Development**, 10: 409–412, 2012.

GSCHWEND, P.; SCHWARZENBACH, R.P. Physical chemistry of organic compounds in the marine environment. **Marine Chemistry**, 39:187-207, 1992.

HADIBARATA, T; TACHIBANA, S. Enhanced chrysene biodegradation in presence of a synthetic surfactant. **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry**, 2: 301–308, 2009.

HAMACHER, C. **Determinação de hidrocarbonetos em amostras de água e sedimento da Baía de Guanabara**. Rio de Janeiro, 1996. 103p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Departamento de Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 45: 51–88, 2005.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, 18: 307-317, 1973.

HIDAYAT, A. *et al.* Determination of chrysene degradation under saline conditions by *Fusarium sp.* F092, a fungus screened from nature. **Fungal Biology**, 116: 706-714, 2012.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Polynuclear Aromatic Compounds**, part 1: Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1983, v. 32, 477 p.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Some Hydrocarbons and Pesticide Exposures**. Lyon: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1986, v. 41, 434 p.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Levantamento de dados da atividade pesqueira na Baía de**

Guanabara como subsídio para a avaliação de impactos ambientais e a gestão da pesca. Rio de Janeiro: IBAMA, 2002.

JAFFÉ, R. Fate of hydrophobic organic pollutants in the aquatic environment: a review. **Environmental Pollution**, 69: 237-257, 1991.

JICA – JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY. **The study on recuperation of the Guanabara Bay ecosystems.** Report. Tokyo: Kokusai Kogyo Co. Ltda., 1994.

JOHNSON, A. R. *et al.* Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, 133 (1): 71-84, 2005.

KENNISH, M. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution.** Boca Raton: Petralia Publications, 1997. 523 p.

KIM, G.B. *et al.* Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. **Marine Pollution Bulletin**, 38: 7-15, 1999.

KJERFVE, B. *et al.* Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. **Continental Shelf Research**, 17: 1609-1643, 1997.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicology Pathology**, 48: 439-46, 1996.

KRUIJF, H.A.M. de. **Manual on Aquatic Ecotoxicology.** New York: Springer-Verlag, 1988. 348 p.

LIMA, A.L.C. **Geocronologia de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs). Estudo de caso: Baía de Guanabara.** Rio de Janeiro, 1996. 106p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

LIMA, E.F.A. **Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento.** Rio de Janeiro, 2001. 184p. Tese

(Doutorado em Química Analítica) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 53 (2): 1-5, 2001.

LIVINGSTONE, D. R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. **Comparative Environmental Physiology**, 7: 145-213, 1991.

LOMBARDI, A.T.; FERNANDEZ, M. Ecotoxicologia. In: NETO, J.A.B.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S.M. (Orgs.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 14, 369-396.

LOWE, D.M.; MOORE, M.N.; EVANS, B.M. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. **Marine Ecology Progress Series**, 91: 135-140, 1992.

LOWE, D.M.; PIPE, R.K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cell: in vitro study. **Aquatic Toxicology**, 30: 357-365, 1994.

LOWE, D.M.; SOVERCHIA, C.; MOORE, M.N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells o mussels experimentally exposed to fluoranthene. **Aquatic Toxicology**, 33: 105-112, 1995.

MACENO, M.M.C. **Avaliação da presença, toxicidade e da possível biomagnificação de HPAs**. Curitiba, 2010. 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental), Departamento de Hidráulica e Saneamento – Universidade Federal do Paraná.

MAHAUT, M.L. *et al.* The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. **Environmental Science and Pollution Research** (2012), doi: 10.1007/s11356-012-1211-7.

MANAHAN, S.E. **Toxicological Chemistry**. 2.ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. 449 p.

MARQUES JUNIOR, A.N.; MORAES, R.B.C.; MAURAT, M.C. Poluição marinha. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. (Orgs.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. cap. 21, p. 505-528.

MASSONE, C.G. **Caracterização de hidrocarbonetos na região costeira do Rio Paraíba do Sul, Estação de Tratamento de Efluentes de Cabiúnas e Emissário de Ipanema, RJ**. Niterói, 2004. 138p. Dissertação (Mestrado em Geoquímica), Departamento de Geoquímica – Universidade Federal Fluminense.

MAYR, L.M. **Avaliação ambiental da Baía de Guanabara com o suporte do geoprocessamento**. Rio de Janeiro, 1998. 405p. Tese (Doutorado em Geociências), Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

McELROY, A.E.; FARRINGTON, J.W.; TEAL, J.M. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In: VARANASI, U., **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic environment**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1989. cap. 1, p. 2-32.

MEADOR, J. P. *et al.* Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 143: 79-165, 1995.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Transport and direct utilization of γ -glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 80: 707–711, 1983.

MENICONI, M.F.G. *et al.* Brazilian Oil Spills Chemical Characterization – Case Studies. **Environmental Forensics**, 3: 303-321, 2002.

MESTRE, C. *et al.* Sponges as sentinels: patterns of spatial and intra-individual variation in trace metal concentration. **Marine Pollution Bulletin**, 64: 80–89, 2012.

MICHALANY, J. **Técnicas histológicas em anatomia patológica**. 3 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998. 295 p.

MONTEIRO-NETO, C.; TUBINO, R.A.; MORAES, L.E.S.; MENDONÇA NETO, J.P.; ESTEVES, G.V.; FORTES, W.L. Associações de peixes na região costeira de Itaipu, Niterói, RJ. **Iheringia Série Zoologia**, 98 (1): 50-59, 2008.

MOORE, M.N. Lysosomes and environmental stress. **Marine Pollution Bulletin**, 13 (2): 42-43, 1982.

MOORE, M.N. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. **Histochemical Journal**, 22: 187–191, 1990.

MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Marine Environmental Research**, 61: 278-304, 2006.

MURICY, G. Sponges as pollution-biomonitorers at Arraial do Cabo, southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, 49: 347-354, 1989.

MURICY, G. *et al.* **Biodiversidade Marinha da Bacia Potiguar: Porifera**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2008. Série Livros, n. 29, 156 p.

MURICY, G.; HAJDU, E. **Porifera brasiliis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. Série livros, n. 17, 104 p.

MURICY, G.; SILVA, O.C. Esponjas marinhas do Estado do Rio de Janeiro: um recurso renovável inexplorado. In: SILVA, S.H.G.; LAVRADO, H.P. (Eds.). **Ecologia dos ambientes costeiros do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 1999. Série Oecologia brasiliensis, v. 7, p. 155-178.

NEFF, J.M. **Bioaccumulation in marine organisms – Effect of contaminants from oil well produced water**. Oxford: Elsevier Science Ltda., 2002. 472 p.

NEFF, J.M. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment – Sources, Fates and Biological Effects**. London: Applied Science Publishers LTD, 1979. 261p.

NEWMAN, M.C.; ROBERTS Jr., M.H.; HALE, R.C. **Coastal and estuarine risk assessment**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 368p.

NRC - National Research Council. **Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1985. 601p.

NUDI, A. H. *et al.* Biomarkers of PAH exposure in *Ucides cordatus*: laboratory assay and field study. **Environmental Research**, 110 (2): 137-145, 2010.

OLIVEIRA, L.P.H. Distribuição geográfica da fauna e flora da Baía de Guanabara. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 45 (3): 709-734, 1947.

OROS, D.R. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in San Francisco Bay: A 10-year retrospective of monitoring in an urbanized estuary. **Environmental Research**, 105: 101-118, 2007.

OUDOT, J. *et al.* Evolution de la contamination et de l'épuration des invertébrés marins après l'échouage de l'Amoco-Cadiz. In:_____. **Amoco Cadiz, fates and effects of the oil spill**. Paris: Centre National pour l'Exploitation des Oceans, 1981. p. 655-666.

PDBG – Programa de Despoluição da Baía de Guanabara. PETROBRAS, CENPES e SEGEN. **Caracterização Preliminar do Impacto do Vazamento Acidental de Óleo Ocorrido em 18/01/00 na Baía de Guanabara**. Rio de Janeiro: Instituto de Biologia e Instituto de Química – UFRJ/. Departamento de Oceanografia e Hidrologia – UERJ/ Departamento de Química – PUC - Rio/ Instituto de Geociências – LAGEMAR - UFF, 2000. 51 p.

PEACHEY, R.L., CROSBY, D.G. Phototoxicity in tropical reef animals. **Marine Environmental Research**, 42: 359–362, 1996.

PEDRETE, T.A. Determinação de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em bÍlis de peixes da Baía de Guanabara – RJ. Rio de Janeiro, 2010. 102p. Monografia (Bacharel e Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Santa Úrsula.

PÉREZ, T. *et al.* Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: concentration and fate of 24 congeners. **Environmental Science & Technology** 37: 2152-2158, 2003.

PÉREZ, T.; VECELET, J; REBOUILLON, P. In situ comparative study of several Mediterranean sponges as potential biomonitors of heavy metals. **Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università di Genova**, 68: 517-525, 2004.

PORIFERA BRASIL. As esponjas. Disponível em: <<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/1-esponjas/geral.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

PRINCE, R.C.; DRAKE, E.N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C.; BOLLAG, J.M.; FRANKENBERGER, W.T.; SIMS, R.C. (Eds.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1999. cap. 5, p. 89-110. 37 v – Agronomy Monograph.

RIBEIRO *et al.* Chemical defense of *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) against tropical predators. **Brazilian Journal of Oceanography**, 58 (4): 315-321, 2010.

RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. Conceptos Generales. In: MORALES, G.C. (Ed.). **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas**: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004. cap. 1, p. 17-22.

ROVER JÚNIOR, L. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 24 (1): 112-119, 2001.

RÜTZLER, K. Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In:_____. **New perspectives in sponge biology**. London: Smithsonian Institute Press, 1990. p. 455–466.

SANTALOVA, E.A. Sterols and related metabolites from five species of sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35: 439-446, 2012.

SANTOS, C.L.; SILVA, M.A.M; SALVADOR, M.V.S. 2004. Dinâmica sazonal e os efeitos das ressacas nas praias de Niterói/RJ. **Revista Brasileira de Geociências**, 34 (3): 355-360.

SAUER, T.C.; BOEHM, P.D. **Hydrocarbon chemistry analytical methods for oil spill assessments**. Washington, D.C.: Marine Spill Response Corporation Technical Report Series 95-032, 1995. 114 p.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, 39: 48-53, 1999.

SCHMIDT, W. The micronucleus test, **Mutation Research**, 31: 9-15, 1975.

SETTE, C.B. *et al.* Formation and Identification of PAHs Metabolites in Marine Organisms, **Marine Environmental Research** (2013), doi: 10.1016/j.marenvres.2013.02.004.

SILVA, D.C.B. **Potencial das esponjas marinhas (Filo Porifera) como biomonitoras de poluição no litoral do Rio de Janeiro, RJ, Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. 203p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Departamento de Invertebrados, Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SIMONEIT, B.R.T. Application of Molecular Marker Analysis to Vehicular Exhaust for Source Reconciliations. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 22: 203-233, 1985.

STEGEMAN, J.J.; LIVINGSTONE, D.R. Forms and functions of cytochrome P450. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, 121: 1-3, 1998.

STRIEDER, N. *et al.* Medidas biológicas e índices de qualidade da água de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, 28 (1): 17-24, 2006.

SVENDSEN, C.; WEEKS, J. M. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the fresh water snail *Viviparus contectus* (Millet). **Marine Pollution Bulletin**, 31: 139-142, 1995.

SUNDT, H. *et al.*, 2012. Biomarker responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water from a North Sea oil field: Laboratory and field assessments. **Marine Pollution Bulletin**, 64: 144-152.

TAM, N.F.Y.; KE, L.; WANG, X.H.; WONG, Y.S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**, 114: 255-263, 2001.

TUBINO, R.A., *et al.* Artisanal Fisheries production in the coastal zone of Itaipu, Niterói, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55 (3): 187-197, 2007.

TURON, X.; GALERA, M.J.; URIZ, M.J. Clearance rates and aquiferous system in two sponges with contrasting life-history strategies. **Journal of Experimental Zoology**, 278: 22-36, 1997.

TURQUE, A.S *et al.* Environmental shaping of sponge associated archeal communities. **PLoS ONE** (2010), doi: 10.1371/journal.pone.0015774.

USP – Univeridade de São Paulo. Protocolo para culturas *in vitro* de células de Porifera – Primorfos. LabCel - Departametro de Fisiologia – Instituto de Biociências.

VARANASI, U.; STEIN, J.E.; NISHIMOTO, M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: VARANASI, U. **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boca Raton: CRC Press, 1989. cap. 4, 93-150 p.

VILANOVA E. *et al.* The impact of a nuclear power plant discharge on the sponge community of a tropical bay (SE Brazil). In: PANSINI, M.; PRONZATO, R.; BAVESTRELLO, G.; MANCONI, R. (eds.). **Sponge science in the new millennium**. Bollettino del Museo Istituto di Biologia dell'Università di Genova, 68: 647-654, 2004.

VINOTHKUMAR, S.; PARAMESWARAN, P.S. Recent advances in marine drug research. **Biotechnology Advances** (2013), doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.02.006.

VOGEL, S. Current-induced flow through living sponges in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 74 (5): 2069-2071, 1977.

WAGENER, A.L.R *et al.* Hydrocarbons in sediments of a chronically contaminated bay: The challenge of source assignment. **Marine Pollution Bulletin**, 64: 284-294, 2012.

WAGNER, C. *et al.* Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). **Marine Biology**, 131:411-421, 1998.

WAKEHAM, S.G. Synchronous-fluorescence spectroscopy and its application to indigenous and petroleum-derived hydrocarbons in lacustrine sediments. **Environmental Science & Technology**, 11: 272-276, 1977.

WALKER, C.H. **Organic Pollutants: an Ecotoxicological Perspective**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 414 p.

WANG, Z.; FINGAS, M.; PAGE, D.S. Oil spill identification. **Journal of Chromatography A**, 843: 369-411, 1999.

WARNE, M. St. J. *et al.* Comparison of the critical concentration and critical volume hypotheses to model non-specific toxicity of individual compounds. **Toxicology**, 66: 187-195, 1991.

WATSON, G. M. *et al.* Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. **Aquatic Toxicology**, 67: 127-142, 2004.

WEBER, W. **Ambiente das Águas no estado do Rio de Janeiro**. Projeto PLANÁGUA-SEMADS/GTZ de Cooperação Técnica Brasil-Alemanha, Rio de Janeiro, 2001.

WEYERMANN, J. *et al.* A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceuticals**, 288: 369-376, 2005.

WILHELM-FILHO, D. *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, 224: 349-357, 2005.

WINKLER, L.W. Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 21: 2843–2855, 1888.

WULFF, J. Ecological interactions and the distribution, abundance, and diversity of sponges. In: BECERRO, M. A; URIZ, M.J.; MALDONADO, M.; TURON, X. (Eds.). **Advances in Sponge Science: Phylogeny, Systematics, Ecology**. v. 61. Oxford: Elsevier, 2012. cap. 4, p. 273-344.

YUNKER, M. B. *et al.* PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**, 33: 489-515, 2002.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2.ed. São Carlos: RiMa, 2011. 478 p.

ZAHN, R.K. *et al.* Assessing consequences of marine pollution by hydrocarbons using sponges as model organisms. **Science of Total Environment**, 20: 147–169, 1981.

ZAHN, R.K. *et al.* The effect of benzo(a)pyrene on sponges as model organisms in marine pollution. **Chemical-Biological Interactions**, 39: 205-220, 1982.

ZAHN, R.K. *et al.* DNA damage by PAH and repair in a marine sponge. **Science of Total Environment**, 26: 137–142, 1983.

ZHOU, J.L.; MASKAOUI, K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. **Environmental Pollution**, 121: 269-281, 2003.

Anexos

Anexo I. Concentrações de HPAs em água (ng L⁻¹) das três estações.

Composto	Itaipu	PraçaXV	Urca
N	0.385	0.201	ND
C1N	ND	ND	ND
C2N	ND	ND	ND
C3N	ND	ND	ND
C4N	ND	ND	ND
ACF	ND	ND	0.697
ACE	ND	0.357	ND
F	ND	ND	ND
C1F	ND	ND	ND
C2F	ND	ND	ND
C3F	ND	ND	ND
DBT	ND	ND	ND
C1DBT	ND	0.277	0.663
C2DBT	ND	0.792	1.876
C3DBT	ND	1.275	3.334
Fe	ND	0.183	0.856
C1Fe	ND	0.445	2.482
C2Fe	ND	1.175	6.916
C3Fe	ND	0.992	7.572
C4Fe	ND	ND	6.594
A	ND	ND	0.387
Fl	0.395	2.638	7.667
Pi	ND	1.465	6.663
C1Pi	ND	0.911	4.951
C2Pi	ND	0.569	5.494
BaA	ND	0.386	5.568
Cr	ND	0.499	4.615
C1Cr	ND	0.361	4.110
C2Cr	ND	ND	3.698
BbFl	ND	0.807	7.165
BkFl	ND	0.369	2.424
BePi	ND	0.454	2.980
BaPi	ND	0.660	5.980
Per	ND	ND	1.100
I-Pi	ND	0.579	5.004
DBahA	ND	ND	1.646
BghiPer	ND	1.600	4.659
TERFd ₁₄	24.802*	47.217	42.199
Σ16HPAs	0.780	10.197	56.312
Σ38HPAs	0.780	16.994	105.102

Legenda: N:Naftaleno; **C1N:** C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); **C2N:** C2 naftalenos; **C3N:** C3 naftalenos; **C4N:** C4 naftalenos; **Ace:** Acenafteno; **Aceft:** Acenaftileno; **F:** Fluoreno; **C1F:** C1 fluorenos; **C2F:** C2 fluorenos; **C3Flu:** C3 fluorenos; **DBT:** Dibenzotiofeno; **C1DBT:** C1 dibenzotiofenos; **C2DBT:** C2 dibenzotiofenos; **C3DBT:** C3 dibenzotiofenos; **Fe:** Fenantreno; **C1Fe:** C1 fenantrenos; **C2Fe:** C2 fenantrenos; **C3Fe:** C3 fenantrenos; **C4Fe:** C4 fenantrenos; **Ant:** Antraceno; **Fl:** Fluoranteno; **Pi:** Pireno; **C1Pi:** C1 pirenos; **C2Pi:** C2 pirenos; **BaA:** Benzo(a)antraceno; **Cr:** Criseno; **C1Cr:** C1 crisenos; **C2Cr:** C2 crisenos; **BbFl:** Benzo(b)fluoranteno; **BkFl:** benzo(k)fluoranteno; **BePi:** Benzo(e)pireno; **BaPi:** Benzo(a)pireno; **Per:** Perileno **I-Pi:** Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DBahA:** Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe:** Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄:** *para*-terfenil_deuterado₁₄; **Σ16HPAs:** somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; **Σ38HPAs:** somatório dos HPAs totais; **ND=** não detectado. *recuperação baixa, concentrações recalculadas.

Anexo II. Concentrações de HPAs em esponjas ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco) de Itaipu.

Composto	IR1	IR2	IR3	IR4	IR5	IR6	IR7	IR8
N	3.424	ND	4.008	4.474	5.273	3.200	ND	4.509
C1N	ND	ND	ND	2.185	2.853	2.166	ND	ND
C2N	9.425	11.725	10.930	9.154	12.857	14.313	4.136	7.888
C3N	16.768	21.077	22.741	19.797	29.928	42.235	7.977	9.120
C4N	32.306	48.039	42.311	31.871	58.573	81.339	15.663	14.814
ACF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND	ND	3.933	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	3.056	ND	ND
C1F	10.858	19.404	17.757	12.276	21.689	21.190	10.781	12.955
C2F	30.630	49.796	44.811	31.143	49.846	62.986	52.409	ND
C3F	70.767	114.063	245.099	101.077	129.422	153.243	212.474	193.044
DBT	2.460	3.935	3.133	2.756	5.460	8.570	6.487	5.745
C1DBT	20.058	25.016	25.170	19.843	32.952	47.644	42.037	40.274
C2DBT	55.590	66.164	90.585	45.375	92.559	127.024	88.954	83.553
C3DBT	44.024	57.487	66.412	36.119	68.757	89.224	88.355	84.297
Fe	4.987	7.195	6.790	6.155	8.271	18.907	7.907	7.226
C1Fe	14.697	23.360	24.705	16.236	29.094	39.595	24.181	22.045
C2Fe	36.003	48.906	68.994	31.878	59.518	86.551	50.047	53.726
C3Fe	35.783	52.121	56.974	40.349	59.877	79.313	68.455	60.939
C4Fe	41.393	66.671	69.057	43.617	46.197	57.360	55.235	59.056
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fl	15.253	19.979	20.299	13.627	24.491	40.269	33.701	37.562
Pi	12.997	16.270	16.649	11.887	21.221	34.371	23.554	29.250
C1Pi	19.121	24.488	26.099	16.043	26.037	29.835	25.943	31.025
C2Pi	13.026	20.998	23.490	13.122	20.251	22.876	23.490	22.274
BaA	2.629	5.459	4.253	2.746	4.508	10.874	4.424	5.192
Cr	6.467	10.572	8.709	6.248	9.292	14.628	13.646	16.666
C1Cr	7.783	13.933	13.060	8.648	13.025	16.289	16.434	17.202
C2Cr	7.975	12.996	15.823	8.433	14.198	21.633	19.720	16.931
BbFl	7.738	14.416	12.065	9.085	13.507	24.404	13.081	14.296
BkFl	2.849	7.239	5.023	3.337	5.822	10.325	6.560	7.015
BePi	3.202	7.247	5.517	3.859	6.804	12.702	10.115	9.523
BaPi	2.196	4.725	3.383	3.064	4.156	5.215	5.607	6.385
Per	ND	ND	ND	ND	ND	1.644	1.365	1.559
I-Pi	5.847	10.179	9.498	6.352	10.498	22.496	14.835	14.456
DBahA	1.407	1.717	ND	1.364	2.182	4.751	1.736	1.740
BghiPer	3.134	5.813	5.190	3.525	6.031	12.318	9.628	9.337
TERFd ₁₄	62.157	56.063	60.254	64.411	50.870	60.184	83.157	74.163
$\Sigma 16\text{HPAs}$	72.130	110.811	101.382	75.724	122.055	218.395	144.793	163.156
$\Sigma 38\text{HPAs}$	540.798	790.990	968.531	565.645	895.148	1226.484	958.935	899.604

Legenda: N:Naftaleno; **C1N:** C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); **C2N:** C2 naftalenos; **C3N:** C3 naftalenos; **C4N:** C4 naftalenos; **Ace:** Acenafteno; **Aceft:** Acenaftileno; **F:** Fluoreno; **C1F:** C1 fluorenos; **C2F:** C2 fluorenos; **C3Flu:** C3 fluorenos; **DBT:** Dibenzotiofeno; **C1DBT:** C1 dibenzotiofenos; **C2DBT:** C2 dibenzotiofenos; **C3DBT:** C3 dibenzotiofenos; **Fe:** Fenantreno; **C1Fe:** C1 fenantrenos; **C2Fe:** C2 fenantrenos; **C3Fe:** C3 fenantrenos; **C4Fe:** C4 fenantrenos; **Ant:** Antraceno; **Fl:** Fluoranteno; **Pi:** Pireno; **C1Pi:** C1 pirenos; **C2Pi:** C2 pirenos; **BaA:** Benzo(a)antraceno; **Cr:** Criseno; **C1Cr:** C1 crisenos; **C2Cr:** C2 crisenos; **BbFl:** Benzo(b)fluoranteno; **BkFl:** benzo(k)fluoranteno; **BePi:** Benzo(e)pireno; **BaPi:** Benzo(a)pireno; **Per:** Perileno **I-Pi:** Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DBahA:** Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe:** Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄:** *para*-terfenil_deuterado₁₄; **$\Sigma 16\text{HPAs}$:** somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; **$\Sigma 38\text{HPAs}$:** somatório dos HPAs totais; **ND=** não detectado.

Anexo III. Concentrações de HPAs em esponjas ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco) da Praça XV.

Composto	PXVR1	PXVR2	PXVR3	PXVR4	PXVR5	PXVR6	PXVR7	PXVR8
N	ND	11.260	8.332	5.348	5.258	2.008	4.997	4.994
C1N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C2N	ND	14.178	12.574	10.339	8.640	9.728	9.349	11.813
C3N	13.422	21.265	13.237	5.934	11.907	21.878	15.214	15.350
C4N	29.001	37.674	26.530	8.074	23.227	44.222	32.136	29.910
ACF	3.465	3.809	4.669	4.980	3.911	4.590	4.182	3.937
ACE	2.045	5.239	3.315	ND	2.694	3.154	2.740	7.023
F	2.750	3.235	2.862	6.294	2.764	3.977	2.733	6.941
C1F	17.451	22.688	17.902	20.231	14.458	21.215	17.633	18.279
C2F	73.556	75.408	68.038	66.460	67.215	83.111	75.529	62.295
C3F	234.223	283.374	285.530	621.403	254.447	264.479	210.049	198.148
DBT	7.393	7.932	6.276	9.280	6.356	12.356	8.368	7.770
C1DBT	44.438	44.400	37.672	32.528	38.243	61.300	46.829	37.572
C2DBT	103.304	116.157	94.091	109.632	89.868	141.011	117.927	85.945
C3DBT	193.570	187.280	177.107	227.286	187.872	207.868	182.370	132.226
Fe	10.078	9.353	8.322	11.630	7.745	13.090	8.441	33.954
C1Fe	25.764	27.306	23.748	35.048	22.540	35.115	29.251	35.292
C2Fe	78.880	85.266	64.548	81.516	74.638	101.020	75.389	71.470
C3Fe	164.165	183.923	157.084	165.230	156.250	194.437	171.288	132.175
C4Fe	190.450	195.832	212.325	165.332	152.451	223.713	181.552	156.557
A	5.626	4.001	5.703	6.082	5.190	6.029	4.887	18.326
Fl	69.279	68.623	67.261	61.216	68.462	87.553	74.432	99.599
Pi	63.113	66.997	55.258	136.602	59.673	76.028	70.375	96.726
C1Pi	127.406	153.535	140.273	239.360	117.381	155.590	127.744	140.967
C2Pi	118.611	132.547	142.669	244.030	133.569	154.515	120.794	126.427
BaA	57.633	67.337	75.914	83.135	57.793	74.551	55.506	89.822
Cr	72.483	76.409	87.374	105.954	69.340	85.767	69.405	84.478
C1Cr	86.562	89.422	121.149	122.068	99.628	112.326	90.059	96.838
C2Cr	78.383	92.191	112.008	136.176	73.446	102.475	95.273	88.305
BbFl	116.283	111.284	144.264	148.686	114.301	144.983	105.979	122.913
BkFl	58.269	60.293	79.528	66.656	61.182	73.367	57.843	64.504
BePi	67.660	65.485	84.034	88.069	68.396	77.188	66.849	71.436
BaPi	71.649	74.809	99.544	103.694	76.487	90.164	66.203	90.613
Per	16.301	16.130	22.339	50.077	17.956	23.839	15.355	18.846
I-Pi	77.416	75.877	100.807	119.173	68.345	100.766	73.822	85.416
DBahA	19.849	22.376	29.459	52.833	17.571	26.932	21.199	26.423
BghiPer	65.707	67.214	78.378	87.151	64.755	89.162	67.073	74.169
TERFd ₁₄	132.549*	78.629	80.261	112.972*	68.925	74.269	68.955	65.875
$\Sigma 16\text{HPAs}$	760.556	790.366	932.163	1081.207	751.103	955.333	753.933	974.333
$\Sigma 38\text{HPAs}$	2366.187	2580.109	2670.125	3437.507	2303.958	2929.507	2378.775	2447.459

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; BbFl: Benzo(b)fluoranteno; BkFl: benzo(k)fluoranteno; BePi: Benzo(e)pireno; BaPi: Benzo(a)pireno; Per: Perileno I-Pi: Indeno(1,2,3-cd)pireno; DBahA: Dibenzo(a,h)antraceno; BghiPe: Benzo(ghi)perileno; TERFd₁₄: para-terfenil_deuterado₁₄; $\Sigma 16\text{HPAs}$: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; $\Sigma 38\text{HPAs}$: somatório dos HPAs totais. ND= não detectado. *surrogate adicionado em maior quantidade.

Anexo IV. Concentrações de HPAs em esponja ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco) da Urca.

Composto	UR1	UR2	UR3	UR4	UR5	UR6	UR7	UR8	UR9	UR10
N	4,438	4,138	3,897	ND	ND	2,176	ND	ND	ND	2,877
C1N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C2N	6,212	8,087	9,359	6,881	6,037	7,843	3,458	7,793	7,701	7,328
C3N	11,552	14,007	18,335	15,532	13,319	13,010	10,304	13,131	13,615	10,210
C4N	34,925	39,479	42,965	39,118	38,898	37,025	28,504	37,857	35,716	23,784
ACF	ND	ND	2,341	2,801	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C1F	8,883	7,631	8,308	9,007	9,299	6,518	4,450	7,437	9,060	4,717
C2F	42,948	61,036	73,205	67,015	53,909	52,722	39,266	61,610	63,498	29,971
C3F	264,973	302,819	348,022	330,413	316,912	246,123	232,866	259,393	322,486	180,441
DBT	ND	ND	2,280	2,769	ND	ND	ND	ND	2,143	ND
C1DBT	12,800	15,110	19,500	20,941	12,951	16,644	11,978	16,840	16,954	8,428
C2DBT	44,726	50,318	81,062	80,496	55,522	67,094	54,447	60,129	75,813	31,921
C3DBT	66,599	84,479	133,539	159,083	77,105	111,329	83,368	81,633	121,246	50,096
Fe	9,246	8,948	14,011	12,072	7,745	8,491	5,885	7,867	10,013	4,079
C1Fe	45,833	46,877	59,482	61,247	46,083	47,211	34,534	43,839	50,302	22,032
C2Fe	193,090	244,188	259,844	264,341	243,597	210,734	176,695	223,384	262,733	96,983
C3Fe	329,304	393,824	438,817	450,098	455,791	364,833	314,008	377,879	478,863	150,694
C4Fe	264,987	301,747	339,398	358,133	360,137	285,812	244,153	287,949	345,841	130,858
A	ND	ND	2,028	2,277	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fl	25,988	23,605	40,425	32,530	23,974	21,666	16,813	24,393	31,043	10,696
Pi	36,649	34,499	47,628	45,845	36,198	31,861	21,995	34,920	78,071	15,733
C1Pi	69,108	65,904	86,355	91,316	78,268	59,431	55,050	67,259	86,170	30,081
C2Pi	84,891	95,501	116,954	110,322	122,756	76,482	67,375	93,169	125,658	36,722
BaA	18,956	14,876	28,295	24,784	18,097	11,919	11,814	13,436	13,021	6,687
Cr	30,418	28,597	44,485	41,411	35,696	31,119	21,614	28,484	33,691	12,800
C1Cr	48,050	42,355	57,687	65,040	64,217	40,136	37,407	49,169	49,020	20,896
C2Cr	68,298	53,128	77,617	85,604	87,078	57,391	47,811	58,688	69,649	27,474

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; ND= não detectado.

Anexo IV. Concentrações de HPAs em esponja ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco) da Urca. (continuação).

Composto	UR1	UR2	UR3	UR4	UR5	UR6	UR7	UR8	UR9	UR10
BbFl	42,023	35,677	56,748	54,543	45,349	36,461	27,595	37,122	33,596	17,067
BkFl	16,781	16,434	23,444	21,550	17,082	14,380	11,077	15,188	12,382	7,177
BePi	24,272	21,048	33,597	32,260	26,477	21,156	17,028	21,973	24,446	10,290
BaPi	19,083	16,498	33,100	31,024	22,087	17,372	14,000	20,022	18,022	10,018
Per	4,859	3,935	6,840	6,563	4,246	3,969	2,106	4,432	3,538	1,424
I-Pi	33,094	27,759	39,493	45,617	36,737	26,468	20,728	30,238	27,798	11,859
DBahA	7,648	7,146	10,006	11,375	9,017	6,678	4,797	7,329	6,143	3,152
BghiPer	29,988	25,763	42,193	42,738	37,701	27,104	20,941	27,221	35,182	12,272
TERFd₁₄	54,114	63,350	64,114	55,933	128,289*	50,209	53,808	103,990*	52,645	26,278
$\Sigma 16\text{HPAs}$	274,312	243,941	388,092	368,566	289,681	235,696	177,259	246,219	298,962	114,418
$\Sigma 38\text{HPAs}$	1900,622	2095,411	2601,259	2624,745	2362,284	1961,160	1642,064	2019,784	2463,413	988,770

Legenda:

BbFl: Benzo(b)fluoranteno; **BkFl**: benzo(k)fluoranteno; **BePi**: Benzo(e)pireno; **BaPi**: Benzo(a)pireno; **Per**: Perileno **I-Pi**: Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DBahA**: Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe**: Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄**: *para*-terfenil_deuterado₁₄; **$\Sigma 16\text{HPAs}$** : somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; **$\Sigma 38\text{HPAs}$** : somatório dos HPAs totais; **ND**= não detectado. *surrogate adicionado em maior quantidade.

Anexo V. Concentrações de HPAs em água e filtro de campo (T0) (ng L⁻¹).

Composto	Água-R1	Água-R2	Água-R3	Filtro-R1	Filtro-R2
N	ND	ND	5,555	ND	ND
C1N	ND	ND	ND	ND	ND
C2N	ND	ND	ND	ND	ND
C3N	ND	ND	2,096	3,622	2,053
C4N	ND	ND	2,041	5,155	2,959
ACF	ND	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND
C1F	ND	ND	ND	2,393	ND
C2F	ND	ND	ND	7,411	4,993
C3F	ND	ND	ND	30,809	22,405
DBT	ND	ND	ND	ND	ND
C1DBT	ND	ND	ND	3,035	2,168
C2DBT	ND	ND	ND	9,942	7,369
C3DBT	2,609	2,005	ND	17,538	12,380
Fe	5,707	5,786	3,685	7,000	4,863
C1Fe	3,940	4,131	ND	9,250	7,266
C2Fe	4,931	5,323	2,516	21,949	16,459
C3Fe	4,938	4,415	2,453	27,571	19,117
C4Fe	4,223	3,471	2,124	34,964	27,803
A	ND	ND	ND	ND	ND
Fl	15,655	15,437	6,725	17,016	13,227
Pi	13,918	12,761	6,064	16,142	14,234
C1Pi	6,991	6,334	3,149	13,800	10,334
C2Pi	4,199	3,435	ND	13,015	9,694
BaA	7,996	8,525	3,405	8,903	7,287
Cr	8,733	9,437	3,163	7,547	6,127
C1Cr	4,869	5,006	ND	10,249	6,032
C2Cr	4,004	3,531	ND	11,936	6,566
BbFl	8,278	10,839	5,789	13,784	11,440
BkFl	ND	ND	2,141	5,875	4,735
BePi	7,636	6,812	2,677	7,047	5,390
BaPi	7,226	7,503	4,244	10,615	8,761
Per	ND	ND	ND	2,538	ND
I-Pi	ND	ND	3,393	11,276	8,886
DBahA	ND	ND	ND	2,545	2,170
BghiPer	7,510	8,045	3,725	12,692	9,830
TERFd ₁₄	47,412	52,967	72,884	68,610	67,879
Σ16HPAs	82,658	85,144	50,565	120,441	96,951
Σ38HPAs	123,361	122,796	64,943	345,617	254,549

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; BbFl: Benzo(b)fluoranteno; BkFl: benzo(k)fluoranteno; BePi: Benzo(e)pireno; BaPi: Benzo(a)pireno; Per: Perileno I-Pi: Indeno(1,2,3-cd)pireno; DBahA: Dibenzo(a,h)antraceno; BghiPe: Benzo(ghi)perileno; TERFd₁₄: para-terfenil_deuterado₁₄; Σ16HPAs: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; Σ38HPAs: somatório dos HPAs totais; ND= não detectado.

Anexo VI. Concentrações de HPAs em tecido de esponjas durante o ensaio de depuração ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco).

Composto	T0h	T0h	T0h	T24h	T24h	T24h	T48h	T48h	T48h	T72h	T72h
N	2.008	3.574	ND	ND	ND	2.085	2.927	2.508	2.572	4.867	ND
C1N	2.930	6.622	5.495	2.528	3.138	3.358	6.615	3.537	3.524	7.129	4.949
C2N	4.422	21.205	36.342	13.470	8.249	15.118	15.479	24.899	19.010	27.377	31.323
C3N	5.579	15.548	11.432	7.942	7.265	6.343	8.429	7.482	8.053	7.885	9.758
C4N	8.319	36.381	29.834	19.860	18.820	13.425	18.017	21.616	16.999	16.296	23.253
ACF	5.346	4.449	3.150	3.301	2.042	2.013	2.255	2.328	2.776	2.424	3.669
ACE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	3.807	2.227	2.213	2.402	ND	ND	2.171	ND	ND	ND
C1F	3.385	5.902	3.377	3.260	2.775	2.464	2.906	4.689	2.866	2.885	3.749
C2F	17.829	26.697	23.188	21.111	20.824	16.559	18.712	24.925	15.400	15.359	18.101
C3F	75.926	94.394	58.525	113.981	69.278	63.275	113.255	134.635	75.057	74.788	129.377
DBT	ND	3.136	2.340	ND	2.422	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C1DBT	7.732	21.445	16.382	14.527	17.374	10.916	18.779	16.607	8.297	9.577	12.992
C2DBT	39.557	102.139	63.594	75.629	83.748	54.193	82.022	74.225	48.704	62.317	64.175
C3DBT	67.345	178.815	111.586	130.981	146.292	123.275	148.956	129.545	78.462	118.273	147.855
Fe	11.255	34.704	14.638	14.887	13.936	8.179	16.255	17.539	6.747	8.111	7.982
C1Fe	29.451	69.455	32.539	38.087	39.038	28.883	34.308	29.590	20.787	26.694	27.650
C2Fe	93.269	233.480	117.639	154.313	160.917	149.842	149.103	130.781	96.251	125.184	190.283
C3Fe	132.542	305.937	169.166	236.323	223.072	256.883	235.089	249.525	165.214	202.729	313.235
C4Fe	105.136	251.557	179.236	212.621	202.246	217.063	201.107	171.938	136.279	210.808	226.461
A	6.477	12.819	4.602	5.687	4.697	3.150	5.960	3.887	2.598	3.321	3.958
Fl	45.211	77.257	30.308	38.976	30.857	21.637	40.508	59.310	21.195	22.054	26.668
Pi	52.499	65.624	43.196	48.885	37.502	20.877	37.011	195.257	20.919	26.202	44.298
C1Pi	47.266	69.523	42.736	51.481	50.987	30.161	38.902	31.450	34.353	37.889	48.413
C2Pi	60.442	85.099	65.401	76.811	76.010	45.927	60.988	59.362	49.188	63.995	88.221
BaA	33.641	41.359	20.476	28.804	15.033	10.688	18.330	17.985	14.102	14.208	17.501
Cr	34.687	41.821	26.435	30.363	20.244	16.185	22.785	19.197	19.088	21.769	30.686
C1Cr	47.603	55.271	55.193	50.515	44.144	29.555	42.437	43.509	35.501	47.123	58.273
C2Cr	60.837	81.446	77.187	84.085	74.897	47.884	61.413	97.651	52.880	87.320	79.088

Legenda:

N: Naftaleno; **C1N:** C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); **C2N:** C2 naftalenos; **C3N:** C3 naftalenos; **C4N:** C4 naftalenos; **Ace:** Acenafteno; **Aceft:** Acenaftileno; **F:** Fluoreno; **C1F:** C1 fluorenos; **C2F:** C2 fluorenos; **C3F:** C3 fluorenos; **DBT:** Dibenzotiofeno; **C1DBT:** C1 dibenzotiofenos; **C2DBT:** C2 dibenzotiofenos; **C3DBT:** C3 dibenzotiofenos; **Fe:** Fenantreno; **C1Fe:** C1 fenantrenos; **C2Fe:** C2 fenantrenos; **C3Fe:** C3 fenantrenos; **C4Fe:** C4 fenantrenos; **Ant:** Antraceno; **Fl:** Fluoranteno; **Pi:** Pireno; **C1Pi:** C1 pirenos; **C2Pi:** C2 pirenos; **BaA:** Benzo(a)antraceno; **Cr:** Criseno; **C1Cr:** C1 crisenos; **C2Cr:** C2 crisenos; **ND=** não detectado.

Anexo VI. Concentrações de HPAs em tecido de esponja durante o ensaio de depuração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (continuação).

Composto	T0h	T0h	T0h	T24h	T24h	T24h	T48h	T48h	T48h	T72h	T72h
BbFl	71.321	74.606	55.616	56.131	41.176	30.747	48.087	43.814	39.945	45.286	59.502
BkFl	19.903	22.847	16.992	16.892	11.639	8.161	14.314	11.285	10.610	13.041	17.029
BePi	30.714	34.403	27.689	26.519	19.730	13.423	21.263	19.753	19.091	22.664	26.134
BaPi	38.969	41.767	25.946	26.600	15.084	15.671	25.827	23.557	19.662	21.326	29.328
Per	7.636	7.949	7.688	5.716	4.506	3.674	6.461	5.788	4.905	6.184	7.288
I-Pi	54.601	57.277	47.717	50.848	34.935	29.461	40.922	34.250	38.595	40.612	47.491
DBahA	19.417	21.724	16.817	17.091	14.888	12.809	17.203	15.704	17.613	18.273	16.893
BghiPer	43.119	48.125	39.335	40.774	29.541	26.837	31.023	28.878	35.308	35.035	40.017
TERFd₁₄	58.958	57.136	58.877	61.239	44.578	58.502	61.871	60.108	62.768	45.996	59.457
$\Sigma 16\text{HPAs}$	469.167	582.355	372.918	405.759	291.304	221.923	344.671	495.252	270.821	299.192	371.154
$\Sigma 38\text{HPAs}$	1286.374	2258.164	1484.024	1721.213	1549.708	1340.722	1607.648	1759.176	1142.553	1449.006	1855.596

Legenda:

BbFl: Benzo(b)fluoranteno; **BkFl**: benzo(k)fluoranteno; **BePi**: Benzo(e)pireno; **BaPi**: Benzo(a)pireno; **Per**: Perileno **I-Pi**: Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DBahA**: Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe**: Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄**: *para*-terfenil_deuterado₁₄; **$\Sigma 16\text{HPAs}$** : somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; **$\Sigma 38\text{HPAs}$** : somatório dos HPAs totais; **ND**= não detectado

Anexo VII. Concentrações de HPAs em tecido de esponja durante o ensaio de depuração ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco).

Composto	T72h	T96h	T96h	T96h	T7d	T7d	T7d	T10d	T10d	T14d	T14d
N	5.116	3.968	2.248	3.212	ND	4.018	2.233	ND	3.864	4.940	ND
C1N	6.885	6.839	6.700	8.648	5.161	7.341	2.960	3.444	6.606	6.739	2.850
C2N	24.340	36.524	34.972	43.371	35.375	34.067	21.910	6.406	20.593	18.544	19.210
C3N	10.169	7.621	12.166	13.937	11.269	11.118	10.396	8.343	9.602	6.643	5.065
C4N	24.130	18.034	ND	44.207	25.609	27.920	23.188	16.598	16.774	9.918	14.551
ACF	ND	ND	2.454	3.354	2.471	3.354	2.771	2.924	4.737	2.339	2.010
ACE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	2.580	1.841	ND	1.885	2.525	2.228	ND	ND
C1F	2.924	3.371	3.506	4.275	3.783	3.561	3.548	4.353	3.393	ND	2.537
C2F	24.045	10.144	27.336	28.250	25.465	12.183	11.018	18.291	16.486	10.954	9.799
C3F	119.996	84.165	103.554	102.909	112.728	98.826	73.962	87.944	76.526	49.188	57.281
DBT	ND	ND	ND	2.138	ND	ND	1.287	1.854	ND	ND	ND
C1DBT	12.669	7.945	12.420	15.665	12.737	10.845	11.440	9.080	9.815	5.680	5.989
C2DBT	78.144	48.197	60.281	62.712	63.284	54.485	47.305	35.400	51.693	23.959	32.230
C3DBT	128.738	106.937	100.428	119.971	130.732	94.769	83.145	4.820	92.018	44.430	59.478
Fe	6.796	7.969	8.055	13.695	9.302	9.097	10.967	13.943	11.106	6.393	4.826
C1Fe	30.074	21.824	22.959	35.127	23.777	28.838	24.037	23.329	20.481	12.696	11.023
C2Fe	149.750	107.115	130.522	112.477	131.145	115.069	75.510	61.425	81.652	60.747	52.690
C3Fe	227.727	172.119	221.648	197.228	228.668	199.585	156.005	113.021	150.532	108.134	108.493
C4Fe	185.421	165.338	189.084	218.665	206.652	184.567	172.050	107.600	159.721	127.813	113.798
A	2.922	2.689	2.973	5.181	3.013	4.163	3.699	4.409	4.547	2.986	2.256
Fl	16.942	20.888	19.069	29.971	22.236	23.807	25.486	35.400	33.055	17.152	13.130
Pi	27.419	49.409	29.095	41.290	30.577	33.137	45.382	62.139	56.346	29.054	25.823
C1Pi	37.525	41.744	49.806	55.083	46.646	48.185	35.072	32.469	43.897	24.931	26.454
C2Pi	83.607	74.610	70.563	98.861	72.476	66.043	77.410	54.532	72.836	48.761	46.539
BaA	12.061	15.297	18.897	20.683	15.382	20.118	17.151	20.681	15.523	9.687	8.619
Cr	21.950	24.688	22.990	30.158	23.779	27.141	23.167	25.402	29.155	17.742	15.206
C1Cr	52.717	56.387	48.384	57.956	58.966	51.814	47.232	37.273	42.380	29.126	33.004
C2Cr	102.931	91.027	88.269	128.813	92.686	85.744	99.027	65.168	77.878	58.438	62.545

Legenda:

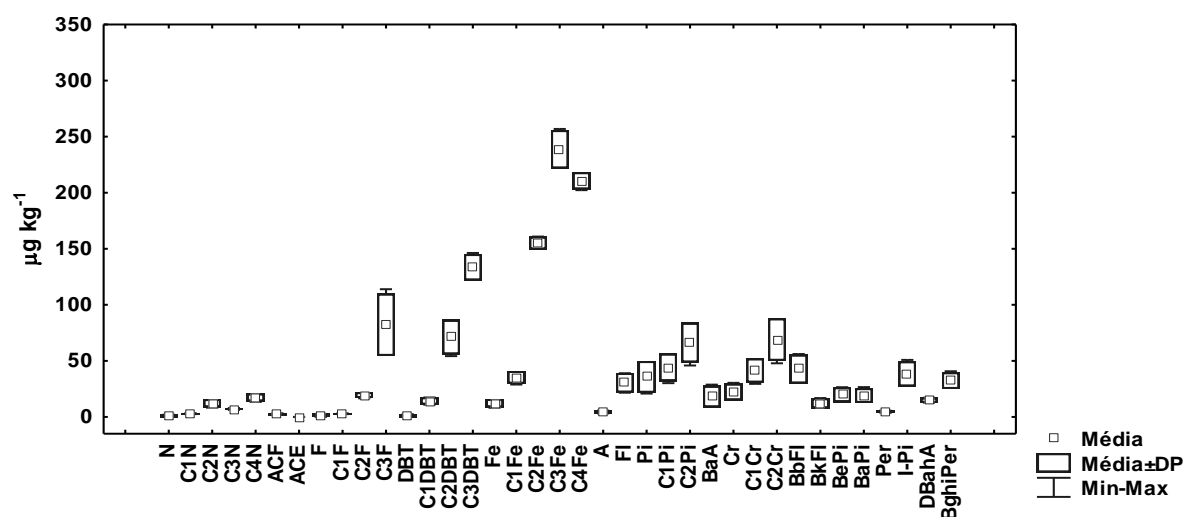
N:Naftaleno; **C1N:** C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); **C2N:** C2 naftalenos; **C3N:** C3 naftalenos; **C4N:** C4 naftalenos; **Ace:** Acenafteno; **Aceft:** Acenaftileno; **F:** Fluoreno; **C1F:** C1 fluorenos; **C2F:** C2 fluorenos; **C3Flu:** C3 fluorenos; **DBT:** Dibenzotiofeno; **C1DBT:** C1 dibenzotiofenos; **C2DBT:** C2 dibenzotiofenos; **C3DBT:** C3 dibenzotiofenos; **Fe:** Fenantreno; **C1Fe:** C1 fenantrenos; **C2Fe:** C2 fenantrenos; **C3Fe:** C3 fenantrenos; **C4Fe:** C4 fenantrenos; **Ant:** Antraceno; **Fl:** Fluoranteno; **Pi:** Pireno; **C1Pi:** C1 pirenos; **C2Pi:** C2 pirenos; **BaA:** Benzo(a)antraceno; **Cr:** Criseno; **C1Cr:** C1 crisenos; **C2Cr:** C2 crisenos; **ND=** não detectado.

Anexo VII. Concentrações de HPAs em tecido de esponja durante o ensaio de depuração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (continuação).

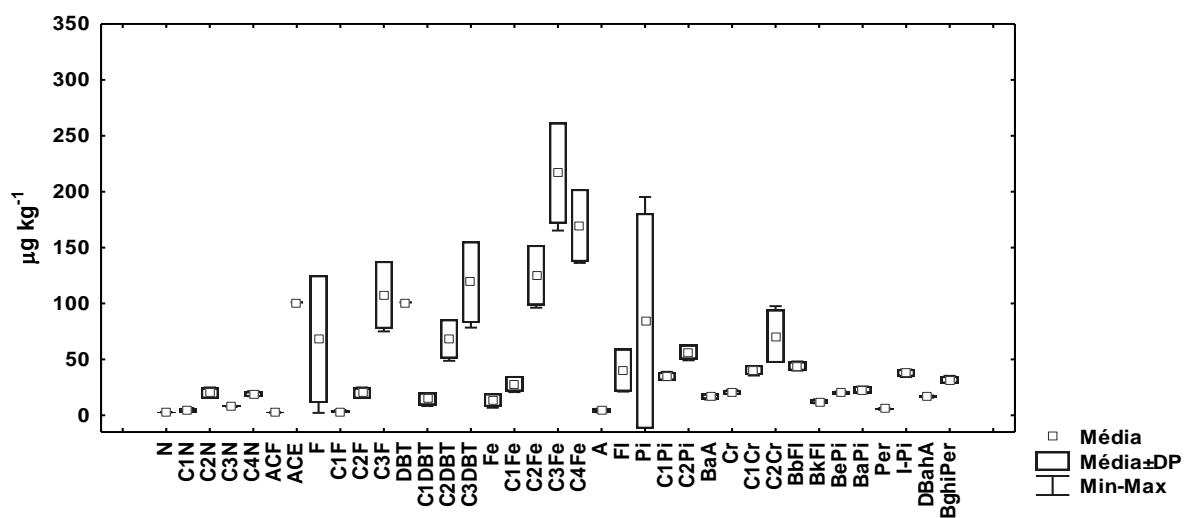
Composto	T72h	T96h	T96h	T96h	T7d	T7d	T7d	T10d	T10d	T14d	T14d
BbFl	39.017	49.011	47.130	57.555	49.994	53.025	59.505	53.748	65.024	42.708	42.676
BkFl	11.392	12.993	14.875	17.150	14.674	15.359	18.926	16.269	18.235	12.559	11.232
BePi	20.773	24.670	22.799	30.124	23.898	23.394	28.996	24.900	33.035	18.952	18.763
BaPi	18.687	21.504	21.005	33.310	21.978	24.815	22.098	23.370	37.230	17.297	19.152
Per	4.811	4.772	3.232	12.228	8.083	6.363	8.455	6.638	7.112	3.923	4.201
I-Pi	30.939	37.164	38.782	50.266	43.286	44.754	48.366	51.968	65.210	40.593	41.071
DBahA	16.874	15.729	17.195	17.013	15.926	16.949	19.423	16.814	22.970	16.504	17.120
BghiPer	26.281	30.672	33.630	42.193	37.140	33.008	34.783	42.760	57.895	34.513	34.310
TERFd₁₄	47.560	56.365	63.523	59.323	61.985	52.167	47.885	55.593	54.623	50.387	51.933
$\Sigma 16\text{HPAs}$	257.170	316.653	301.196	395.155	313.657	336.138	362.952	394.726	457.933	273.421	256.193
$\Sigma 38\text{HPAs}$	1563.771	1381.365	1487.027	1760.253	1610.741	1477.461	1349.795	1095.238	1420.155	924.046	923.929

Legenda:

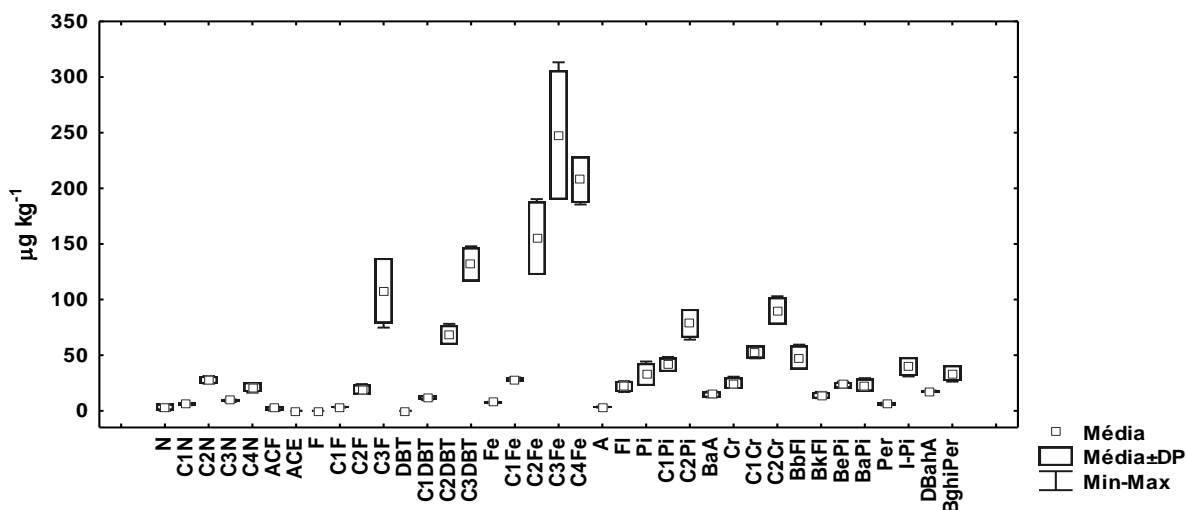
BbFl: Benzo(b)fluoranteno; **BkFl**: benzo(k)fluoranteno; **BePi**: Benzo(e)pireno; **BaPi**: Benzo(a)pireno; **Per**: Perileno **I-Pi**: Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DbahA**: Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe**: Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄**: *para*-terfenil_deuterado₁₄; **$\Sigma 16\text{HPAs}$** : somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; **$\Sigma 38\text{HPAs}$** : somatório dos HPAs totais; **ND** = não detectado.



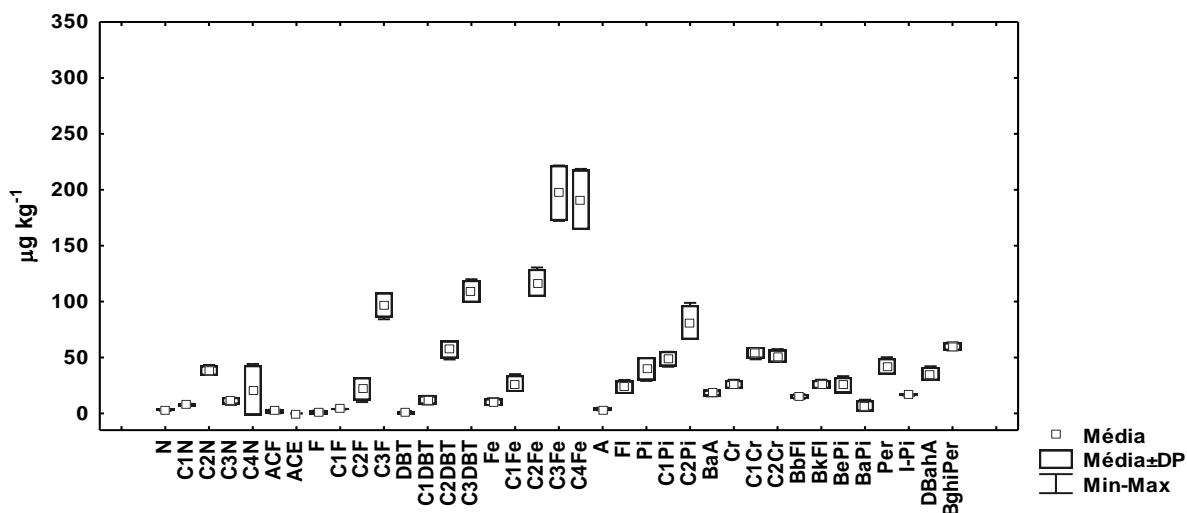
Anexo VIII. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=3) em T24h da depuração.



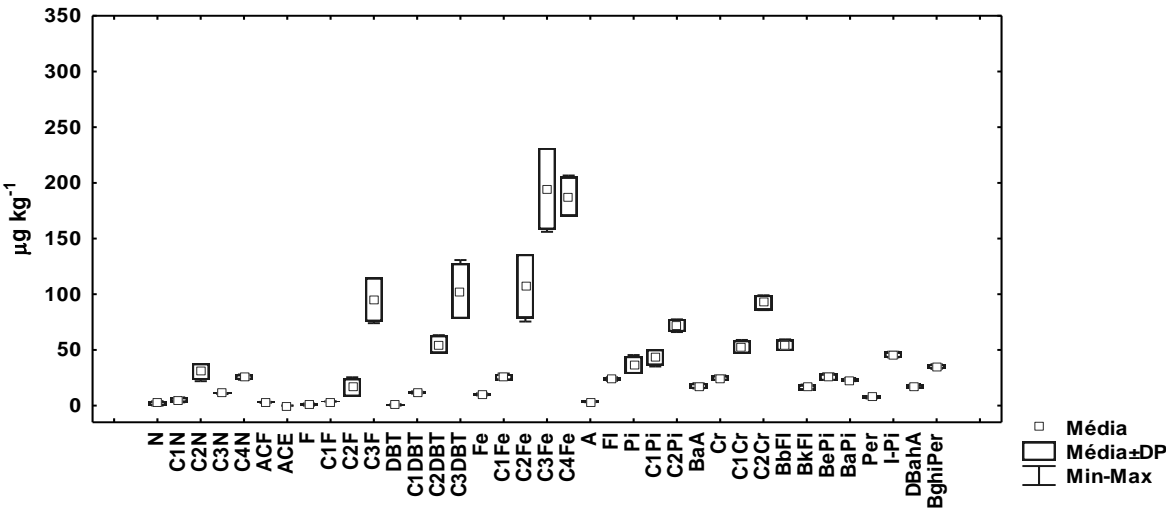
Anexo IX. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=3) em T48h da depuração.



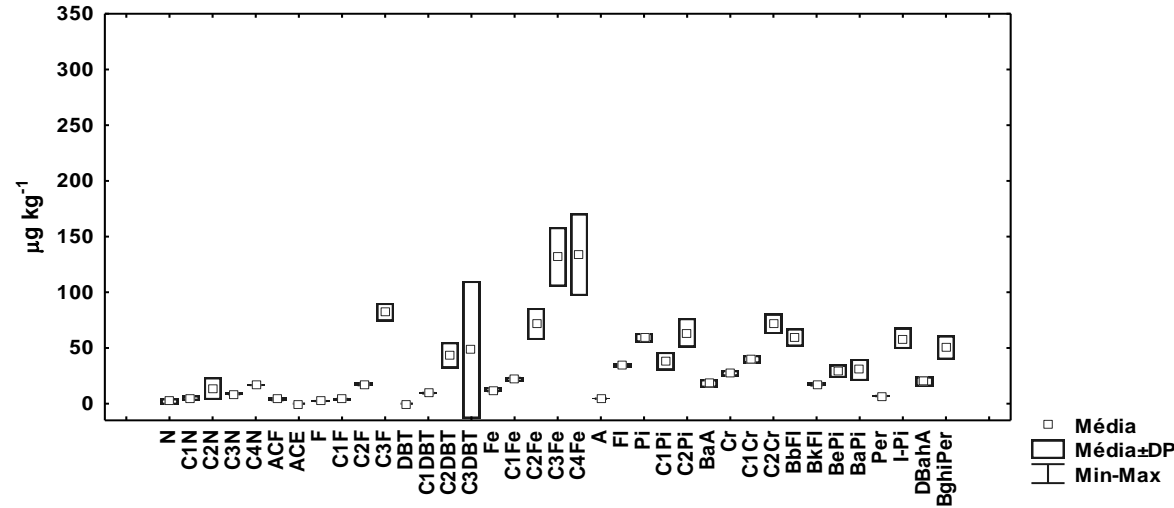
Anexo X. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=3) em T72h da depuração.



Anexo XI. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=3) em T96h da depuração.



Anexo XII. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=3) em T168h da depuração.



Anexo XIII. Variação e tipologia dos HPAs nas esponjas (N=2) em T240h da depuração.

Anexo XIV. Concentrações de HPAs em amostras de água e filtro – T0 (ng L⁻¹).

Composto	Água-R1	Água-R2	Água-R3	Filtro
N	ND	ND	2.104	ND
C1N	ND	ND	ND	ND
C2N	2.481	ND	2.130	ND
C3N	2.849	2.044	3.088	2,224
C4N	3.310	2.922	4.327	4,021
ACF	ND	2.689	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND
C1F	ND	ND	ND	7,598
C2F	2.974	3.596	3.702	28,977
C3F	23.553	27.146	26.746	77,476
DBT	ND	ND	ND	0,863
C1DBT	ND	ND	ND	2,958
C2DBT	2.441	3.503	3.929	12,235
C3DBT	3.417	6.064	5.349	15,383
Fe	ND	ND	3.575	14,942
C1Fe	ND	6.744	9.365	24,610
C2Fe	3.922	13.069	14.341	38,258
C3Fe	3.276	11.091	10.940	148,957
C4Fe	2.691	7.462	6.694	42,218
A	ND	ND	ND	3,188
Fl	ND	44.827	20.700	34,168
Pi	ND	62.141	17.372	44,663
C1Pi	ND	33.926	17.701	37,207
C2Pi	ND	13.376	10.456	21,729
BaA	ND	35.214	12.594	21,864
Cr	ND	32.909	10.846	19,080
C1Cr	ND	14.314	7.532	12,730
C2Cr	ND	4.494	3.830	5,660
BbFl	ND	43.889	12.493	20,193
BkFl	ND	19.033	6.022	7,947
BePi	ND	27.936	6.067	12,418
BaPi	ND	44.528	9.492	19,978
Per	ND	8.966	ND	3,251
I-Pi	ND	30.900	5.918	15,278
DBahA	ND	5.773	1.919	3,496
BghiPer	ND	32.066	5.203	14,633
TERFd ₁₄	79.330	93.174	147.055	89,122
Σ16HPAs	0.000	381.905	114.304	231,849
Σ38HPAs	50.914	540.622	244.434	718,204

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; BbFl: Benzo(b)fluoranteno; BkFl: benzo(k)fluoranteno; BePi: Benzo(e)pireno; BaPi: Benzo(a)pireno; Per: Perileno I-Pi: Indeno(1,2,3-cd)pireno; DBahA: Dibenzo(a,h)antraceno; BghiPe: Benzo(ghi)perileno; TERFd₁₄: para-terfenil_deuterado₁₄; Σ16HPAs: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; Σ38HPAs: somatório dos HPAs totais; ND= não detectado.

Anexo XV. Concentrações de HPAs em água de alguns aquários (ng L⁻¹).

Composto	T72 sem esponja	T96 sem esponja	T24	T96
N	5,010	2,655	ND	6,036
C1N	ND	ND	ND	ND
C2N	4,899	2,909	3,269	4,162
C3N	5,019	3,115	3,159	4,741
C4N	4,981	2,164	4,625	3,313
ACF	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND
C1F	ND	ND	ND	ND
C2F	4,435	2,710	4,856	2,521
C3F	82,022	53,915	90,612	47,247
DBT	ND	ND	ND	ND
C1DBT	ND	ND	ND	ND
C2DBT	6,174	3,644	3,819	2,789
C3DBT	8,091	8,831	8,807	16,311
Fe	2,709	3,111	ND	2,028
C1Fe	ND	ND	ND	ND
C2Fe	3,092	ND	2,396	ND
C3Fe	2,080	ND	ND	ND
C4Fe	2,392	2,662	ND	ND
A	ND	ND	ND	ND
Fl	ND	ND	ND	ND
Pi	ND	ND	ND	ND
C1Pi	137,770	40,676	5,357	6,417
C2Pi	5,732	ND	2,003	ND
BaA	ND	ND	ND	ND
Cr	28040,188	12961,040	2127,308	2606,099
C1Cr	112,930	29,723	4,344	3,543
C2Cr	ND	ND	ND	ND
BbFl	ND	ND	ND	ND
BkFl	ND	ND	ND	ND
BePi	ND	ND	ND	ND
BaPi	ND	ND	ND	ND
Per	ND	ND	ND	ND
I-Pi	ND	ND	ND	ND
DBahA	ND	ND	ND	ND
BghiPer	ND	ND	ND	ND
TERFd ₁₄	79,444	67,588	61,964	64,432
Σ16HPAs	28047,906	12966,806	2127,308	2614,164
Σ38HPAs	28427,524	13117,155	2260,556	2705,208

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; BbFl: Benzo(b)fluoranteno; BkFl: benzo(k)fluoranteno; BePi: Benzo(e)pireno; BaPi: Benzo(a)pireno; Per: Perileno I-Pi: Indeno(1,2,3-cd)pireno; DBahA: Dibenzo(a,h)antraceno; BghiPe: Benzo(ghi)perileno; TERFd₁₄: para-terfenil_deuterado₁₄; Σ16HPAs: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; Σ38HPAs: somatório dos HPAs totais; ND= não detectado.

Anexo XVI. Concentrações de HPAs em tecido do mesmo indivíduo ($\mu\text{g kg}^{-1}$ Peso seco).

Composto	T0indiv	T24indiv	T48indiv	T72indiv	T96indiv
N	8,099	5,328	7,160	8,023	11,320
C1N	6,145	2,252	5,201	3,437	6,404
C2N	57,211	28,446	32,366	32,158	39,175
C3N	11,497	8,091	11,213	14,620	12,580
C4N	19,588	12,482	14,110	19,020	19,850
ACF	ND	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	3,165	ND
C1F	5,795	5,215	5,044	6,599	5,667
C2F	22,092	18,451	26,946	22,375	27,836
C3F	62,457	70,429	91,199	77,332	73,180
DBT	ND	ND	ND	ND	ND
C1DBT	5,649	3,449	4,913	7,020	4,987
C2DBT	16,375	8,250	15,102	12,689	15,691
C3DBT	26,591	15,196	30,695	22,533	22,644
Fe	10,826	14,324	13,094	16,472	11,256
C1Fe	17,169	16,116	15,313	15,428	15,231
C2Fe	51,617	40,793	43,319	32,467	41,191
C3Fe	289,681	333,982	481,045	157,663	307,747
C4Fe	60,591	43,929	17,742	45,594	39,730
A	ND	1,890	1,473	ND	ND
Fl	6,809	12,507	10,046	25,716	7,663
Pi	6,660	11,230	8,187	72,753	7,398
C1Pi	11,979	40,969	53,747	48,466	55,732
C2Pi	15,077	11,508	13,425	9,128	11,923
BaA	ND	3,433	ND	ND	ND
Cr	22,550	4729,952	6173,199	6499,003	7992,754
C1Cr	9,719	27,264	35,879	34,514	37,472
C2Cr	9,526	5,232	5,410	6,111	6,075
BbFl	5,351	6,161	4,498	4,713	4,193
BkFl	2,143	2,494	1,684	ND	ND
BePi	3,696	3,172	2,543	13,079	2,172
BaPi	2,864	4,145	3,160	7,697	ND
Per	ND	ND	ND	ND	ND
I-Pi	6,916	3,942	4,159	10,028	4,936
DBahA	1,607	ND	ND	ND	ND
BghiPer	4,762	4,602	5,052	44,115	7,438
TERFd ₁₄	87,101	70,407	80,547	78,622	104,590
$\Sigma 16\text{HPAs}$	82,281	4803,181	6234,256	6701,600	8049,130
$\Sigma 38\text{HPAs}$	781,041	5495,236	7136,927	7271,919	8792,244

Legenda: N: Naftaleno; **C1N:** C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); **C2N:** C2 naftalenos; **C3N:** C3 naftalenos; **C4N:** C4 naftalenos; **Ac:** Acenafteno; **Acft:** Acenaftileno; **F:** Fluoreno; **C1F:** C1 fluorenos; **C2F:** C2 fluorenos; **C3Flu:** C3 fluorenos; **DBT:** Dibenzotiofeno; **C1DBT:** C1 dibenzotiofenos; **C2DBT:** C2 dibenzotiofenos; **C3DBT:** C3 dibenzotiofenos; **Fe:** Fenantreno; **C1Fe:** C1 fenantrenos; **C2Fe:** C2 fenantrenos; **C3Fe:** C3 fenantrenos; **C4Fe:** C4 fenantrenos; **Ant:** Antraceno; **Fl:** Fluoranteno; **Pi:** Pireno; **C1Pi:** C1 pirenos; **C2Pi:** C2 pirenos; **BaA:** Benzo(a)antraceno; **Cr:** Criseno; **C1Cr:** C1 crisenos; **C2Cr:** C2 crisenos; **BbFl:** Benzo(b)fluoranteno; **BkFl:** benzo(k)fluoranteno; **BePi:** Benzo(e)pireno; **BaPi:** Benzo(a)pireno; **Per:** Perileno **I-Pi:** Indeno(1,2,3-cd)pireno; **DBahA:** Dibenzo(a,h)antraceno; **BghiPe:** Benzo(ghi)perileno; **TERFd₁₄:** para-terfenil_deuterado₁₄; $\Sigma 16\text{HPAs}$: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; $\Sigma 38\text{HPAs}$: somatório dos HPAs totais; **ND**= não detectado.

Anexo XVII. Concentrações de HPAs em tecido de indivíduos diferentes ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco).

Composto	T0	T24	T48	T72	T96
N	4.560	4.507	5.267	11.221	6.684
C1N	4.379	3.851	4.589	8.283	4.177
C2N	52.902	58.852	55.335	80.744	215.764
C3N	9.966	10.865	10.933	17.775	26.322
C4N	12.532	22.219	16.041	19.848	24.390
ACF	ND	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND
C1F	4.719	6.852	6.498	7.168	9.486
C2F	21.604	23.414	23.257	32.074	37.473
C3F	67.933	129.182	63.228	98.644	169.168
DBT	ND	ND	ND	ND	ND
C1DBT	5.233	5.764	5.441	7.288	8.917
C2DBT	22.618	20.111	19.520	25.209	18.731
C3DBT	27.510	28.103	26.475	37.560	24.162
Fe	8.546	14.494	11.176	15.220	11.407
C1Fe	18.394	20.821	15.851	19.746	20.361
C2Fe	68.802	53.035	55.638	76.778	206.380
C3Fe	814.222	685.047	389.715	300.193	173.701
C4Fe	111.148	75.779	61.101	54.921	93.975
A	ND	ND	1.800	ND	ND
Fl	7.112	10.417	9.783	13.049	10.765
Pi	9.939	13.457	11.253	21.583	11.676
C1Pi	22.003	88.872	159.326	169.904	174.986
C2Pi	21.788	20.741	16.337	21.315	21.522
BaA	ND	ND	ND	ND	ND
Cr	34.597	10330.057	16140.277	18172.636	16027.180
C1Cr	7.323	62.072	103.148	124.294	126.470
C2Cr	10.661	9.236	9.328	16.039	9.529
BbFl	4.961	5.919	5.857	8.274	4.985
BkFl	2.737	1.938	2.706	3.898	2.388
BePi	2.224	3.411	3.560	5.225	3.441
BaPi	1.897	3.506	2.929	3.986	1.795
Per	ND	1.674	ND	1.603	ND
I-Pi	6.861	7.487	6.619	11.483	5.974
DBahA	1.993	ND	ND	1.907	ND
BghiPer	5.947	7.254	7.114	13.378	9.842
TERFd ₁₄	78.254	96.176	87.016	88.761	78.327
$\Sigma 16\text{HPAs}$	91.373	10402.445	16207.439	18280.907	16096.135
$\Sigma 38\text{HPAs}$	1395.113	11728.933	17246.482	19399.492	17461.650

Legenda: N: Naftaleno; C1N: C1 naftalenos (1-Metilnaftaleno e 2-Metilnaftaleno); C2N: C2 naftalenos; C3N: C3 naftalenos; C4N: C4 naftalenos; Ace: Acenafteno; Aceft: Acenaftileno; F: Fluoreno; C1F: C1 fluorenos; C2F: C2 fluorenos; C3Flu: C3 fluorenos; DBT: Dibenzotiofeno; C1DBT: C1 dibenzotiofenos; C2DBT: C2 dibenzotiofenos; C3DBT: C3 dibenzotiofenos; Fe: Fenantreno; C1Fe: C1 fenantrenos; C2Fe: C2 fenantrenos; C3Fe: C3 fenantrenos; C4Fe: C4 fenantrenos; Ant: Antraceno; Fl: Fluoranteno; Pi: Pireno; C1Pi: C1 pirenos; C2Pi: C2 pirenos; BaA: Benzo(a)antraceno; Cr: Criseno; C1Cr: C1 crisenos; C2Cr: C2 crisenos; BbFl: Benzo(b)fluoranteno; BkFl: benzo(k)fluoranteno; BePi: Benzo(e)pireno; BaPi: Benzo(a)pireno; Per: Perileno I-Pi: Indeno(1,2,3-cd)pireno; DBahA: Dibenzo(a,h)antraceno; BghiPe: Benzo(ghi)perileno; TERFd₁₄: para-terfenil_deuterado₁₄; $\Sigma 16\text{HPAs}$: somatório dos 16HPAs prioritários USEPA; $\Sigma 38\text{HPAs}$: somatório dos HPAs totais; ND= não detectado.