



Roberta Lyrio Santos Neves

**Avaliação da contaminação de óleo no ambiente
estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação
fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclicos
Aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes *Mugil liza***

Dissertação de Mestrado

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

Orientadores: Prof. Roberta Lourenço Ziolli

Prof. Terezinha Ferreira de Oliveira

Rio de Janeiro
fevereiro de 2006



Roberta Lyrio Santos Neves

**Avaliação da contaminação de óleo no ambiente
estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela
determinação fluorimétrica de
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
(HPAs) na bÍlis de peixes *Mugil liza***

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

Prof^a. Roberta Lourenço Ziolli

Orientadora

Departamento de Química – PUC-Rio

Dra. Zuleica Carmem Castilhos

Centro de Tecnologia Mineral – UFRJ

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do

Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2006

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

Roberta Lyrio Santos Neves

Graduou-se em Engenharia Química na PUC-Rio em 1996. Trabalhou na L'Oréal de 1996 a 2003, na área de regulamentação de cosméticos. Participou de diversos congressos na área ambiental.

Ficha Catalográfica

Neves, Roberta Lyrio Santos

Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estatutário da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de hidrocarboretos policíclicos aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes Mugil Liza / Roberta Lyrio Santos Neves ; orientadores: Roberta Lourenço Ziolli, Terezinha Ferreira de Oliveira. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Química, 2006.

120 f. : il. ; 30 cm

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

CDD: 540

Aos meus pais, Lúcia e José Eduardo,
e a minha irmã, Renata,
por serem uma família incrível.

Agradecimentos

À minha orientadora, Roberta Lourenço Ziolli, pela confiança em mim depositada e pelo apoio neste trabalho.

À minha orientadora, Terezinha Ferreira de Oliveira, pela amizade e pelo incentivo ao longo deste trabalho.

Ao professor Ricardo Queiroz Aucélio pelo empréstimo do equipamento e pela ótima acolhida no seu laboratório.

Aos amigos, Pedro Cavalcanti e Nédio Araújo, por toda a amizade dentro e fora do laboratório.

Aos amigos, Ana Paula, Bruno, Camila, Carol, Diego, José Victor e Letícia, por toda a ajuda nas coletas e pela ótima convivência no laboratório.

À Yaneth pela amizade e por todas as noites insones, fundamentais para esse trabalho.

À Livia e Bernardo, companheiros nesse desafio.

Aos amigos do LEEA, Wagner, Carlos, Ilfran, Alessandra, Flávia e João, pela apoio e amizade ao longo deste trabalho.

À professora Angela Rebelo Wagener por todo o material emprestado.

À equipe do LABMAM, em especial ao Ricardo, Cláudia, Adriana e Francine por toda a ajuda fornecida.

Ao CNPq e a PUC pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

À prof. Isabel Moreira por todo material emprestado.

Ao Anselmo pela ajuda com o espectrofotômetro.

Ao Jorge, Charles e Carlão pelo empréstimo de equipamentos.

À todos da secretária do departamento pela ajuda, em especial a Fátima.

Ao Sr. Irani e ao Nico pelas coletas na Baía de Guanabara e em Itaipu.

À Ana Paula Rodrigues pela ajuda com os peixes e pela companhia sempre divertida.

Ao Alexandre Azevedo pelo apoio e carinho nestes últimos meses.

e a todos os meus amigos e familiares que sempre me incentivaram e souberam entender minha ausência neste período.

Resumo

Neves, Roberta Lyrio Santos. **Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes *Mugil liza***. Rio de Janeiro, 2006. 120p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são poluentes ubíquos na natureza sendo os derrames de óleo uma das principais fontes destes compostos para os ambientes aquáticos costeiros. Este trabalho avalia a possibilidade de uso dos metabólitos de HPAs na bÍlis do peixe *Mugil liza* (tainha) como biomarcadores no monitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos. Para esta avaliação realizou-se um monitoramento sazonal na Baía de Guanabara, RJ, área cronicamente contaminada por óleo, e em Itaipu, Niterói, RJ, como área controle. Nos locais de coleta foram medidos parâmetros físico-químicos tais como, pH, oxigênio dissolvido, entre outros e selecionados os peixes variando entre 35 e 51 cm para maior homogeneidade das amostras. Em laboratório foram feitas medidas morfo-métricas dos indivíduos e retirado o seu líquido biliar. O método analítico foi otimizado e seus parâmetros de desempenho analítico foram determinados. As amostras de líquido biliar foram diluídas em etanol 48% (1:2000 v/v) e analisadas por fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, 332 nm e 383 nm. A média das concentrações de HPAs totais na bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara foi significativamente diferente da área controle, Itaipu. Na Baía de Guanabara, valores de $7,0 \pm 3,4$ (n=19) e $10,4 \pm 6,4$ (n=12) mg de equivalentes (eqv.) de pireno L^{-1} foram obtidos, respectivamente, no inverno e no verão. Em Itaipu, a concentração de HPAs foi de $1,8 \pm 0,7$ (n=11) mg de eqv. de pireno L^{-1} . Estes resultados indicam que o método é capaz de diferenciar áreas recentemente contaminadas por óleo de áreas não contaminadas, sendo o peixe *Mugil liza* um possível biomonitor para esta área. Este método analítico apresenta vantagens em relação a outros métodos, tais como tempo e custo de análise reduzidos, podendo ser usado em levantamento de dados preliminares nos programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chave

HPAs, biomarcador, *Mugil liza*, bÍlis, Baía de Guanabara

Abstract

Neves, Roberta Lyrio Santos. **Evaluation of the oil contamination of the estuarine environment of the Guanabara Bay (RJ) by the fluorometric determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the *Mugil liza* fish bile.** Rio de Janeiro, 2006. 120p. MSc. Dissertation – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous in the environment. The main source of contamination is antropogenic, and oil spills are one of the main PAHs sources for the aquatic environment. This work evaluates the usage of PAH metabolites in fish bile (*Mugil liza*) as biomarkers in the aquatic environment. For this evaluation two distinct areas were monitores: Guanabara Bay, RJ, known for its chronic oil contamination, and Itaipu, Niterói, RJ, the control area. Physico-chemical measurements: pH, dissolved oxygen, conductivity and transparency were made in situ and fish varying from 35 to 50 cm were selected for sampling homogeneity and sexual maturity. In the laboratory, morphometric measures were taken and the fish bile was extracted. After optimizing the analytical method the samples were analysed by diluting each bile sample in ethanol 48% (1:2000 v/v) and fluorimetric measurements were made in excitation/emission wavelengths of 332 nm/383 nm. The mean total PAHs concentrations in the bile samples collected in the Guanabara Bay were significantly different from the control area, Itaipu. In the Guanabara Bay the means were $7,0 \pm 3,4$ (n=19) and $10,4 \pm 6,4$ (n=12) mg L⁻¹ pyrene equivalents, in winter and summer, respectively. In Itaipu, the mean HPA concentration was $1,8 \pm 0,7$ (n=11) mg L⁻¹ pyrene equivalents. These results indicate that this method can differentiate contaminated areas from non contaminated ones, making the fish *Mugil liza* one possible biomonitor in the Guanabara Bay, RJ. Additionally, this analytical method has advantages compared to other methods because it is less time consuming and is inexpensive and therefore could be used as a preliminary monitoring tool.

Keywords

PAHs, biomarker, *Mugil liza*, bile, Guanabara Bay

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Objetivo geral	19
1.2. Objetivos específicos	19
2. Petróleo no meio ambiente aquático	21
2.1. Fontes de contaminação por óleo	21
2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	23
2.2.1. Fontes de contaminação por HPAs	24
2.2.2. Propriedades físico-químicas dos HPAs	26
2.3. Distribuição dos HPAs no ambiente aquático	27
3. Toxicidade dos HPAs	32
3.1. Considerações Gerais	32
3.2. Metabolismo dos HPAs em peixes	33
3.2.1. O metabolismo do pireno	37
3.3. A bÍlis e a formação de biliverdina	38
3.3.1. A bÍlis	38
3.3.2. A formação de biliverdina	39
4. Monitoramento ambiental	41
4.1. Biomarcadores	42
5. Ecologia e biologia do peixe <i>Mugil liza</i> (tainha)	46
5.1. <i>Mugil liza</i> (tainha)	46
5.2. Análise biométrica	48
5.2.1. Estimativa do Peso Total (W_T) e Comprimento Padrão (L_P)	49
5.2.2. Fator de condição (K)	49
5.3. Órgãos reprodutores	50
5.3.1. Estágios de maturação sexual	51
6. Determinação de HPAs em peixes	53
6.1. Técnicas de extração e <i>clean-up</i>	53

6.2. Determinação de HPAs em bÍlis de peixe	55
6.3. Fluorescência molecular	57
7. Áreas de estudo	60
7.1. Baía de Guanabara, RJ	60
7.1.1. Poluição por petróleo e derivados na Baía de Guanabara	63
7.1.2. Estudos de HPAs na Baía de Guanabara	65
7.1.3. Praia de Ipiranga, Magé	67
7.2. Itaipu, Niterói	68
8. Parte experimental	71
8.1. Coleta dos peixes e medição dos parâmetros físico-químicos	71
8.2. Amostragem dos peixes	72
8.3. Análise da bÍlis	74
8.3.1. Escolha do sistema solvente	74
8.3.2. Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão	75
8.3.3. Curva analítica	75
8.3.4. Absorção molecular	75
8.3.5. Estudo do efeito de matriz	76
8.3.6. Determinação de HPAs total por fluorescência na bÍlis de peixe	76
8.3.7. Limpeza do material	77
8.4. Análise de HPAs totais em água	77
8.4.1. Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão	77
8.4.2. Curva analítica	77
8.4.3. Coleta de água	78
8.4.4. Extração de HPAs totais	78
8.4.5. Determinação de HPAs total por fluorescência em água	79
8.4.6. Limpeza do material	79
8.5. Análise estatística dos dados	79
9. Resultados e discussões	81
9.1. Otimização da análise de HPAs em bÍlis de peixe	81
9.1.1. Escolha do sistema solvente	81
9.1.2. Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão	83
9.1.3. Parâmetros de desempenho analítico	84
9.1.4. Efeito de matriz	87
9.1.5. Adição de analito	89

9.2. Comparação entre Baía de Guanabara e Itaipu	92
9.2.1. Parâmetros físico-químicos	92
9.2.2. Análise morfométrica dos peixes	93
9.2.3. Análise da bÍlis	98
9.2.4. Análise por fluorescência - método sincronizado	102
9.2.5. Correlação entre as variáveis	104
9.2.6. Determinação de HPAs totais em água	106
10. Conclusões e Considerações finais	109
11. Referências bibliográficas	114

Lista de figuras

Figura 1. Representação estrutural de alguns HPAs.	24
Figura 2. Representação da distribuição dos hidrocarbonetos no meio aquático.	29
Figura 3. Esquema de biotransformação de xenobióticos.	35
Figura 4. Mecanismo de ativação dos HPAs.	36
Figura 5. Representação esquemática simplificada do metabolismo do benzo[a]pireno.	37
Figura 6. Estrutura do pireno.	38
Figura 7. Canalículo bilífero.	39
Figura 8. Oxidação do anel heme até a formação de biliverdina.	40
Figura 9. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas ao estresse causado por poluentes em um sistema biológico.	43
Figura 10. <i>Mugil liza</i> .	47
Figura 11. Diagrama do corpo do peixe e as medidas utilizadas.	48
Figura 12. Métodos de determinação de HPAs em bÍlis de peixe.	56
Figura 13. Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente.	58
Figura 14. Mapa do estado do Rio de Janeiro, destacando em vermelho a região metropolitana e em azul a Baía de Guanabara.	60
Figura 15. Curral próximo a praia de Ipiranga, Magé.	67
Figura 16. trecho da Carta náutica 1501 indicando a região dos currais próximos a praia de Ipiranga, Magé.	68
Figura 17. Mapa do Estado do Rio de Janeiro, com destaque para a cidade de Niterói.	69
Figura 18. Abertura do indivíduo.	72
Figura 19. Identificação do sexo do peixe pela análise visual das gônadas.	73
Figura 20. Localização da vesícula biliar.	73
Figura 21. Retirada do líquido biliar.	73
Figura 22. Espectro de excitação ($\lambda_{em} = 383 \text{ nm}$) e emissão ($\lambda_{ex} = 332 \text{ nm}$) do pireno em etanol 48%.	84
Figura 23. Curva analítica da solução de pireno em etanol 48% (n=4) em condições otimizadas.	85
Figura 24. Coloração do líquido biliar das amostras utilizadas no teste do efeito de matriz.	88

Figura 25. Gráfico do aumento do efeito de matriz com a diminuição das diluições das amostras.	88
Figura 26. Gráfico de adição de analito usando a bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara.	90
Figura 27. Gráfico de adição de analito usando a bÍlis dos peixes coletados em Itaipu.	91
Figura 28. Distribuição de frequência do comprimento total dos indivíduos coletados	94
Figura 29. Gráfico de Boxplot do comprimento total, classificado por coleta.	94
Figura 30. Proporção sexual dos indivíduos capturados.	95
em todas as coletas da Baía de Guanabara e Itaipu.	95
Figura 31. Gráfico de Boxplot do peso, classificado por sexo.	96
Figura 32. Gráfico de Boxplot do comprimento total, classificado por sexo.	96
Figura 33. Espectros de emissão fluorescente das bÍlis diluídas da Baía de Guanabara e Itaipu.	98
Figura 34. Gráfico de Boxplot da concentração de HPAs na bÍlis dos peixes, por coleta.	100
Figura 35. Espectro de fluorescência sincronizada ($\Delta\lambda=51$ nm) para bÍlis de peixes coletados na Baía de Guanabara.	103
Figura 36. Dendograma de similaridade dos valores absolutos das correlações absolutas das distâncias pelo método de Ward.	105
Figura 37. Curva analítica de soluções de pireno em diclorometano (n=3).	106

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentração de alguns HPAs em diferentes derivados de petróleo.	25
Tabela 2. Valores máximos permitidos para alguns HPAs ($\mu\text{g L}^{-1}$).	26
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos de alguns HPAs.	28
Tabela 4. Concentrações de HPAs encontrados na água, sedimento e biota da Baía de Guanabara.	66
Tabela 5. Valores de referência para o HPAs totais para estimar o nível de contaminação em tecido de peixes (peso úmido).	66
Tabela 6. Análise de variância do experimento.	82
Tabela 7. Estimativas dos efeitos e coeficientes com os respectivos intervalos de confiança de 95%.	82
Tabela 8. Valores de \hat{Y} para a equação de regressão obtida do experimento fatorial 2^3 .	83
Tabela 9. Análise de variância da curva de regressão.	85
Tabela 10. Parâmetros físico-químicos.	93
Tabela 11. Número de machos e fêmeas capturados.	95
Tabela 12. Estimativa da média do peso (kg) dos peixes coletados*.	95
Tabela 13. Estimativa da média do comprimento total (cm) dos peixes coletados*.	96
Tabela 14. Análise de variância do fator de condição em relação as coletas.	97
Tabela 15. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta da Baía de Guanabara, agosto/2005.	99
Tabela 16. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta de Itaipu, agosto/2005.	99
Tabela 17. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta de Itaipu, setembro/2005.	99
Tabela 18. Análise de variância das concentrações de HPAs por coleta.	100
Tabela 19. Matriz de correlação das variáveis.	104
Tabela 20. Análise de variância da curva de regressão.	107
Tabela 21. Concentração de HPAs medidos em amostras de água*.	108

Lista de quadros

Quadro 1. Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs.	33
Quadro 2. Fatores e níveis do experimento.	81
Quadro 3. Parâmetros de desempenho analítico.	86
Quadro 4. Cor e valores de absorvância à 380 nm das amostras utilizadas no teste do efeito de matriz.	87
Quadro 5. Cor e valor de absorvância das amostras utilizadas no teste de adição de analito.	89
Quadro 6. Equações das regressões lineares das adições de analito e seu coeficiente de correlação (R^2).	90
Quadro 7. Data e coordenadas da coletas.	92
Quadro 8. Estimativa das médias dos valores do fator de condição (K)*.	97
Quadro 9. Média da concentração de HPAs em mg L^{-1} de equivalentes de pireno na bÍlis dos peixes (<i>Mugil liza</i>) capturados, separados por sexo*.	99
Quadro 10. Estimativa das médias das concentrações de HPAs (μg de equivalentes de pireno mL^{-1} de bile) por coleta*.	100
Quadro 11. Concentrações de HPAs em bÍlis de peixe em locais contaminados.	102
Quadro 12. Codificação das variáveis categóricas.	104
Quadro 13. Concentrações de HPAs na água da Baía de Guanabara.	108

Antes tarde do que muito tarde.

Wagner Pacheco, num final de tarde chuvoso.