

9 Resultados e discussões

9.1. Otimização da análise de HPAs em bÍlis de peixe

9.1.1. Escolha do sistema solvente

A fim de otimizar o sistema solvente para a diluição da bÍlis foi utilizado o modelo fatorial 2^3 , em duplicata visando estudar o efeito de três fatores: tipo de solvente, proporções solvente/Água e o tempo de ultra-som em minutos. Antes do uso do ultra-som partículas de pireno eram visÍveis na solução. Estes fatores foram distribuÍdos nos seguintes nÍveis do Quadro 2:

Quadro 2. Fatores e nÍveis do experimento.

Fator		NÍveis	
		-1	+1
S_i	Solvente	Etanol	Propanol
P_j	Proporção	25%	48%
T_k	Tempo de ultra-som	15	30

A anÁlise de variância acusou como significativos: o tempo de ultra-som, as interações duplas e a interação tripla ($p < 0,05$) (Tabela 6).

A normalidade dos resÍduos foi testada pelo teste de Anderson-Darlin, com o valor de $p = 0,999$ e para homogeneidade de variância foi usado o teste de Bartlett com o valor de $p = 0,433$.

A partir da Tabela 7 é possÍvel obter a estimativa do sinal para a equação de regressão (x):

$$\hat{Y} = 41,000 + 10,576T - 12,753SP - 4,770ST + 10,637PT - 12,685SPT, \quad R^2 = 97,88 \quad (10)$$

($\pm 1,248$) ($\pm 1,248$)

Tabela 6. Análise de variância do experimento

Causa de Variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Solvente (S)	1	0,3	0,3	0,01	0,919
Proporção (P)	1	46,0	46,0	1,85	0,211
Tempo de ultra-som (T)	1	1789,7	1789,7	71,83	0,000
(S) x (P)	1	2602,2	2602,2	104,45	0,000
(S) x (T)	1	364,0	364,0	14,61	0,005
(P) x (T)	1	1810,2	1810,2	72,66	0,000
(S) x (P) x (T)	1	2574,6	2574,6	103,34	0,000
Resíduo	8	199,3	24,9		
Total	15	9386,3			

Tabela 7. Estimativas dos efeitos e coeficientes com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Causa de variação	Efeito	t(8)	p	Coeficiente	Erro-padrão	IC _i 95%	IC _s 95%
Média	41,000	32,856	0,000	41,000	1,248	38,123	43,878
Solvente (S)	0,262	0,105	0,919	0,131	1,248	-2,746	3,009
Proporção (P)	-3,391	-1,359	0,211	-1,696	1,248	-4,573	1,182
Tempo (T)	21,152	8,475	0,000	10,576	1,248	7,699	13,454
(S) x (P)	-25,506	-10,220	0,000	-12,753	1,248	-15,631	-9,875
(S) x (T)	-9,540	-3,822	0,005	-4,770	1,248	-7,647	-1,892
(P) x (T)	21,273	8,542	0,000	10,637	1,248	7,759	13,514
(S) x (P) x (T)	-25,370	-10,165	0,000	-12,685	1,248	-15,563	-9,807

Utilizando apenas os efeitos considerados significativos e substituindo as variáveis codificadas de acordo com o Quadro 2 na equação 10 a melhor resposta ou o melhor sinal (\hat{Y}), é para o solvente etanol, na proporção de 48% e tempo de ultra-som de 30 minutos (Tabela 8), sendo esta a condição otimizada utilizada na metodologia de análise de HPAs em bÍlis de peixe.

Cabe ressaltar que a proporção etanol/água de 48% já vem sendo utilizada por muitos autores para a análise de metabólitos de HPAs na bÍlis de peixe (Beyer *et al.*, 1996; Aas *et al.*, 1998) mas não sendo informado como foi feita esta escolha.

Tabela 8. Valores de \hat{Y} para a equação de regressão obtida do experimento fatorial 2^3 .

Média	T	(P) x (T)	(S) x (T)	(S) x (P)	(S) x (T) x (P)	\hat{Y}	T	P	S
41,000	10,576	10,637	-4,770	-12,753	-12,865				
	-1	1	1	1	-1	36,223	-1	-1	-1
	-1	1	-1	-1	1	45,899	-1	-1	1
	-1	-1	1	-1	1	15,085	-1	1	-1
	-1	-1	-1	1	-1	24,489	-1	1	1
	1	-1	-1	1	1	20,271	1	-1	-1
	1	-1	1	-1	-1	61,607	1	-1	1
	1	1	-1	-1	-1	92,421	1	1	-1
	1	1	1	1	1	32,005	1	1	1

9.1.2.

Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Para determinação do melhor comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) foram obtidos espectros de excitação mantendo o λ_{em} fixo e variando o λ_{exc} de 200 a 400 nm.

Apesar de vários autores reportarem o uso do λ_{exc} e λ_{em} de 341 nm e 383 nm, respectivamente, para os HPAs de quatro anéis, após o refinamento dos espectros podemos observar pelo espectro que o pico de excitação e emissão que têm intensidades correspondentes são os picos nos λ_{exc} e λ_{em} foram de 332 e 383 nm (Figura 22). Esta diferença observada dos valores reportados em literatura para os valores aqui obtidos pode estar relacionada a diferença da matriz usada e do composto de referência, já que o composto normalmente estudado é o 1-hidroxipireno.

Ariese e colaboradores (2005b) reportaram que para otimizar o comprimento de onda foi usado a bÍlis de um peixe contaminado em laboratório com pireno a fim de ter apenas o metabólito de interesse em seu meio natural. Esta maneira de abordar o problema é a mais indicada já que os λ_{exc} e λ_{em} dos compostos de referência não serão exatamente os mesmos das espécies conjugadas.

Um parâmetro que não foi otimizado foi a o tamanho da banda espectral de passagem de excitação e emissão. As bandas de 4 nm foram utilizadas neste trabalho uma vez que já vinham sendo utilizadas com sucesso em trabalhos prévios desenvolvidos no Laboratório de Estudos Ambientais da PUC-Rio (Melo *et al.*, 2005). Além disso, alguns artigos reportam o uso de bandas espectrais de

passagem de 2,5 nm ou 5 nm como as ideais para este tipo de medição (Lin *et al.*, 1996; Vuontisjärvi *et al.*, 2004; Ariese *et al.*, 2005b).

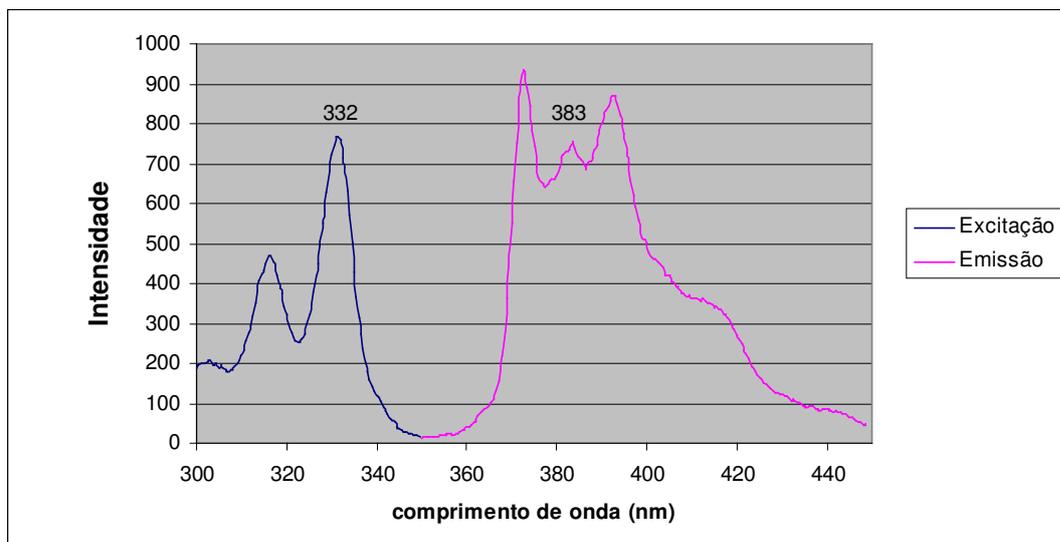


Figura 22. Espectro de excitação ($\lambda_{em} = 383$ nm) e emissão ($\lambda_{ex} = 332$ nm) do pireno em etanol 48%.

9.1.3. Parâmetros de desempenho analítico

Para a determinação da faixa analítica de trabalho construiu-se uma curva analítica utilizando 7 soluções-padrão com concentrações entre 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos pela diluição da solução estoque de pireno. Esta faixa de trabalho foi escolhida já que todas as amostras coletadas se encontravam dentro desta faixa de trabalho, em sua maioria no meio da curva, região de menor incerteza da curva. Foram feitas 4 replicatas de cada concentração, obtendo-se a seguinte curva analítica (Figura 23):

$$\hat{Y}_c = 5,401 + 9,653x, \quad R^2 = 99,98\% \quad (11)$$

$(\pm 0,300) \quad (\pm 0,030)$

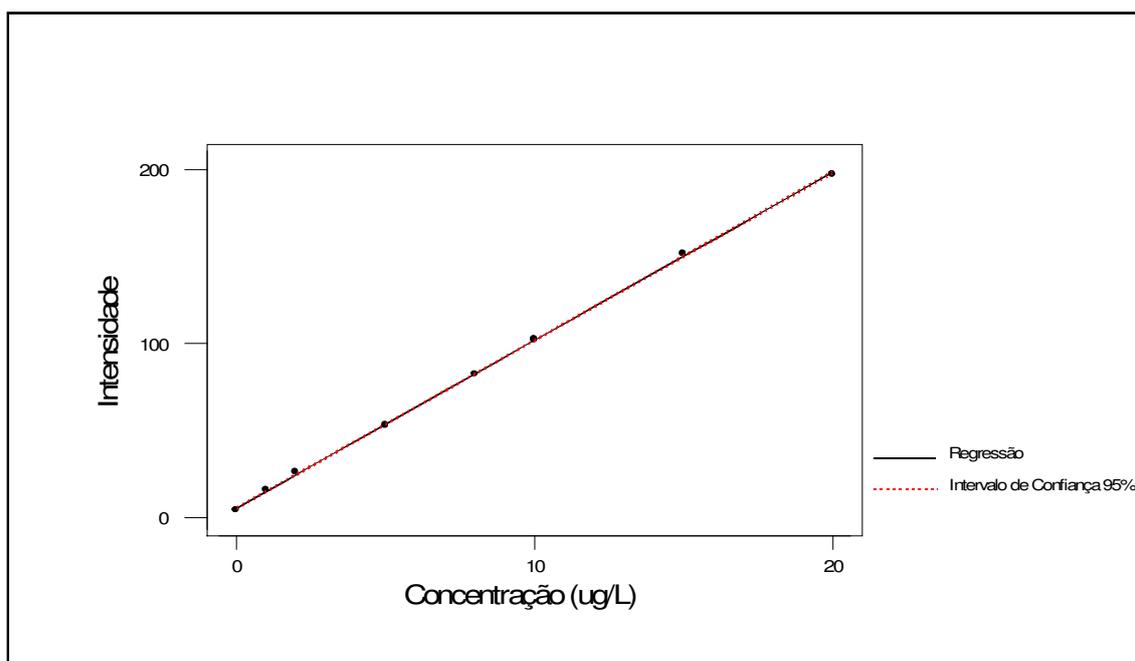


Figura 23. Curva analítica da solução de pireno em etanol 48% (n=4) em condições otimizadas.

A Tabela 9 mostra a análise de variância da curva de regressão com $p = 0,000$. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância também foram testados apresentando $p=0,216$ e $p=0,932$ para o teste de Anderson-Darling e Bartlett respectivamente.

Tabela 9. Análise de variância da curva de regressão.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Regressão	1	131919,000	131919,000	106961,351	0,000
Resíduo	30	37,000	1,233		
Total	31	131956,000			

Como os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância foram válidos, o mínimo valor detectável (ou limite de detecção) referente à concentração, x_0 , e o mínimo valor quantificável (ou limite de quantificação) referente à concentração x_0 , podem ser obtidos pelas equações (13) e (14):

$$x_D = \frac{3,29\sqrt{QME}}{\hat{B}_1} \quad (13)$$

onde \hat{B}_1 corresponde ao coeficiente angular da curva analítica calculada e QME corresponde a média do quadrado dos resíduos.

$$x_D = \frac{3,29\sqrt{1,233}}{9,653} = 0,3785 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$x_Q = \frac{10\sqrt{QME}}{\hat{B}_1} \quad (14)$$

onde \hat{B}_1 corresponde ao coeficiente angular da curva analítica calculada e QME corresponde a média do quadrado dos resíduos (de Freitas, 2003).

$$x_Q = \frac{10\sqrt{1,233}}{9,653} = 1,504 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

O cálculo do mínimo valor detectável (ou limite de detecção) foi baseado na teoria do teste estatístico de hipótese, com probabilidades de falso positivo (α) e falso negativo (β), considerando-se $\alpha = \beta = 5\%$.

Os parâmetros de desempenho analítico se encontram no Quadro 3:

Quadro 3. Parâmetros de desempenho analítico.

Equação	$\hat{Y}_c = 5,401 + 9,653x$, $R^2 = 99,98\%$ ($\pm 0,300$) ($\pm 0,030$)
Faixa de trabalho	2 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$
Limite de detecção	0,3785 $\mu\text{g L}^{-1}$
Limite de quantificação	1,504 $\mu\text{g L}^{-1}$

9.1.4. Efeito de matriz

Outros constituintes da bÍlis, além dos HPAs, podem absorver a luz que chega na cubeta durante a medição de fluorescência das amostras. Para observarmos como o efeito de matriz pode afetar o sinal de fluorescência medido, foram feitas medições da transmitância, à 332 nm, comprimento de onda de excitação usado nas análises de fluorescência.

Neste estudo foram usadas soluções com diferentes diluições do líquido biliar em etanol 48%. As amostras de bÍlis utilizadas neste teste foram escolhidas buscando variação de cor do líquido biliar e diferentes valores da absorvância das amostras diluídas a 1% medidas em 380 nm (Quadro 4 e Figura 24). Todas as bÍlis usadas neste teste foram retiradas de peixes coletados na Baía de Guanabara.

É importante monitorar os parâmetros de cor da bÍlis e absorvância à 380 nm já que, quanto maior o tempo que o peixe ficar sem se alimentar mais concentrada estará sua bÍlis. Isto ocorre porque quando o peixe se alimenta, a bÍlis é liberada no duodeno e a vesícula biliar se enche de água e concentrando ao longo do tempo em que o peixe estiver em jejum. Vários autores usam a concentração de biliverdina, pigmento presente na bÍlis, como indicativo do “status alimentar” do peixe (Ariese *et al.*, 1997; Aas *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004). Para tal, medições espectrofotométricas das amostras foram feitas no comprimento de onda de 380 nm. Como o padrão de biliverdina não estava disponível para este trabalho foram feitas medições de absorvância para fins comparativos.

Quadro 4. Cor e valores de absorvância à 380 nm das amostras utilizadas no teste do efeito de matriz.

Código da amostra	Cor do líquido biliar	Absorvância
51	verde musgo	1,069
52	verde musgo	0,900
53	castanho	0,531
54	marrom	1,005
58	castanho claro	0,590

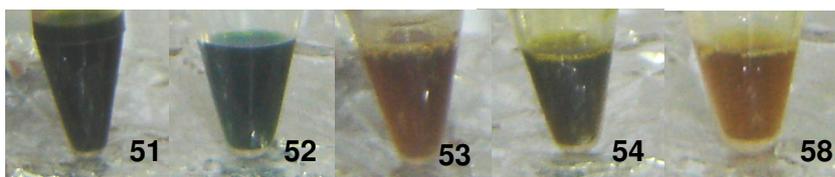


Figura 24. Coloração do líquido biliar das amostras utilizadas no teste do efeito de matriz.

Pela Figura 25 percebe-se que o efeito de matriz se torna mais acentuado a medida que a concentração do líquido biliar aumenta. Assim, neste trabalho foi adotada a diluição de 1:2000, já que, para todas as amostras coletadas, ela foi suficiente para obter valores dentro da faixa de trabalho da curva analítica e as amostras indicaram que estas eram suficientemente transparentes, evitando assim problemas de interferência de outros compostos presentes na biliar. Aas e colaboradores (2000) concluíram que uma diluição 1:1000 a 1:2000 deve ser, em geral, suficiente para evitar esse efeito mas, em alguns casos, pode ser necessária uma diluição maior para que o sinal medido esteja dentro da faixa de trabalho.

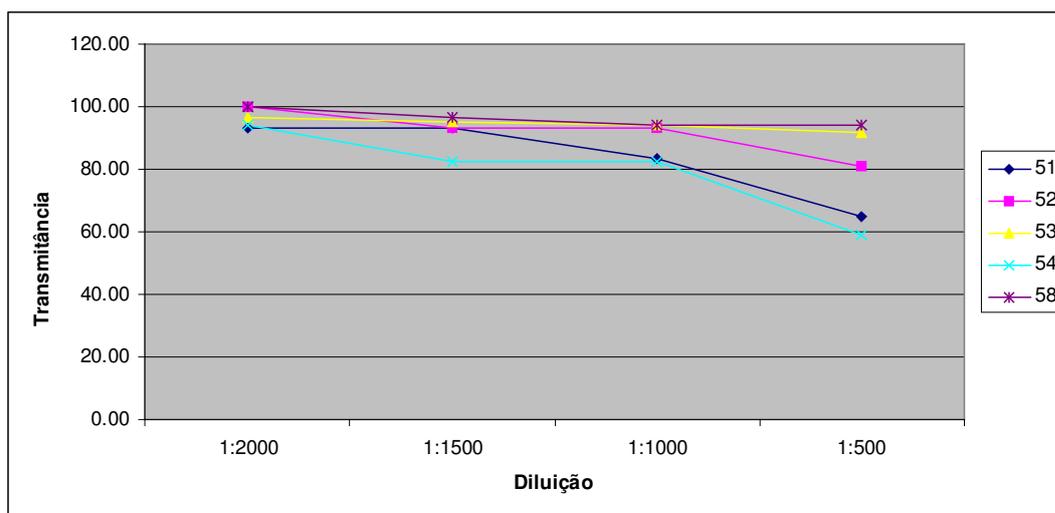


Figura 25. Gráfico do aumento do efeito de matriz com a diminuição das diluições das amostras.

9.1.5. Adição de analito

Outro teste que pode ser feito para estudar se a matriz afeta o sinal analítico dos compostos de interesse é a adição de analito. Uma curva analítica é feita com a adição da substância de referência na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Um indício de que não há interferência de matriz é o caso em que as curvas analíticas sejam paralelas (Ribani *et al.*, 2004).

Foram feitas três adições de analito tanto para amostras provenientes da Baía de Guanabara quanto para as oriundas de Itaipu. Foram escolhidas bÍlis com cores e valores de absorvância diferentes para uma maior heterogeneidade das amostras (Quadro 5 e Quadro 6).

No gráfico da Figura 26 nota-se que há pouca interferência da matriz já que as curvas obtidas com as soluções contendo a bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara são aproximadamente paralelas à curva obtida para as soluções-padrão, mesmo para as bÍlis que apresentaram mais compostos fluorescentes. No caso das bÍlis de peixes de Itaipu, as retas foram praticamente coincidentes (Figura 27), independente da cor da amostra. Para a análise das amostras utilizou-se então, a curva analítica preparada somente com solvente, sem a presença da matriz, por ser uma técnica mais simples de análise.

Quadro 5. Cor e valor de absorvância das amostras utilizadas no teste de adição de analito.

Código da amostra	Cor do líquido biliar	Absorvância
Baía de Guanabara		
51	verde musgo	1,069
53	castanho	0,531
54	marrom	1,005
Itaipu		
31	marrom	0,654
38	verde musgo	0,908
40	castanho claro	0,237

Quadro 6. Equações das regressões lineares das adições de analito e seu coeficiente de correlação (R^2).

	Amostra	Equação da reta	R^2
Solvente		$\hat{Y}_s = 6,248 + 9,503 x$ ($\pm 1,510$) ($\pm 0,181$)	99,20 %
Baía de Guanabara (BG)	51	$\hat{Y}_{BG} = 141,386 + 8,1188 x$ ($\pm 8,119$) ($\pm 0,353$)	99,40 %
	53	$\hat{Y}_{BG} = 25,354 + 9,078 x$ ($\pm 0,588$) ($\pm 0,070$)	99,98 %
	54	$\hat{Y}_{BG} = 76,923 + 8,617 x$ ($\pm 1,437$) ($\pm 0,172$)	99,85 %
Itaipu	31	$\hat{Y}_{Itaipu} = 10,109 + 8,939 x$ ($\pm 1,216$) ($\pm 0,146$)	99,94 %
	38	$\hat{Y}_{Itaipu} = 7,801 + 8,686 x$ ($\pm 2,372$) ($\pm 0,284$)	99,71 %
	40	$\hat{Y}_{Itaipu} = 14,699 + 8,826 x$ ($\pm 7,511$) ($\pm 0,900$)	99,94 %

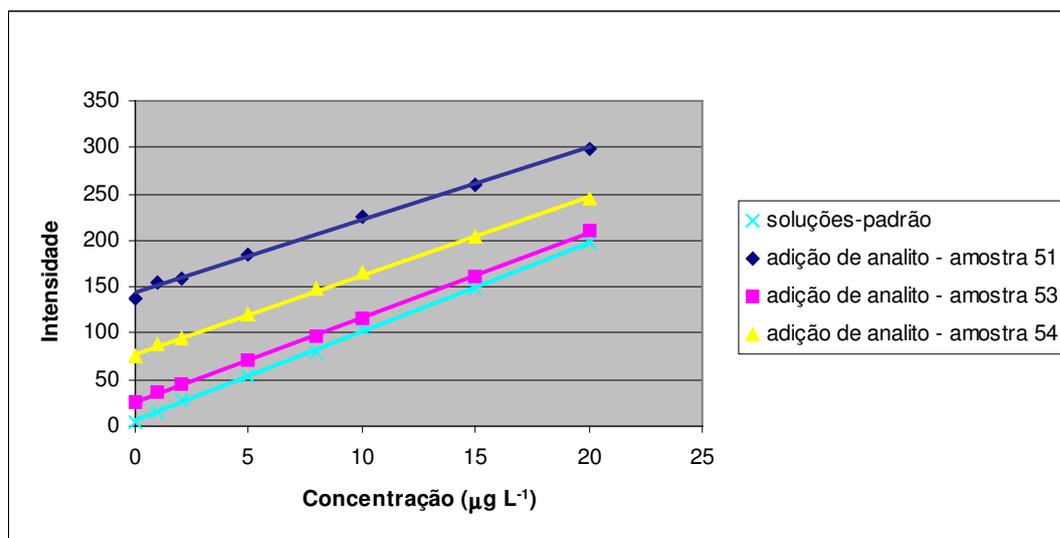


Figura 26. Gráfico de adição de analito usando a bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara.

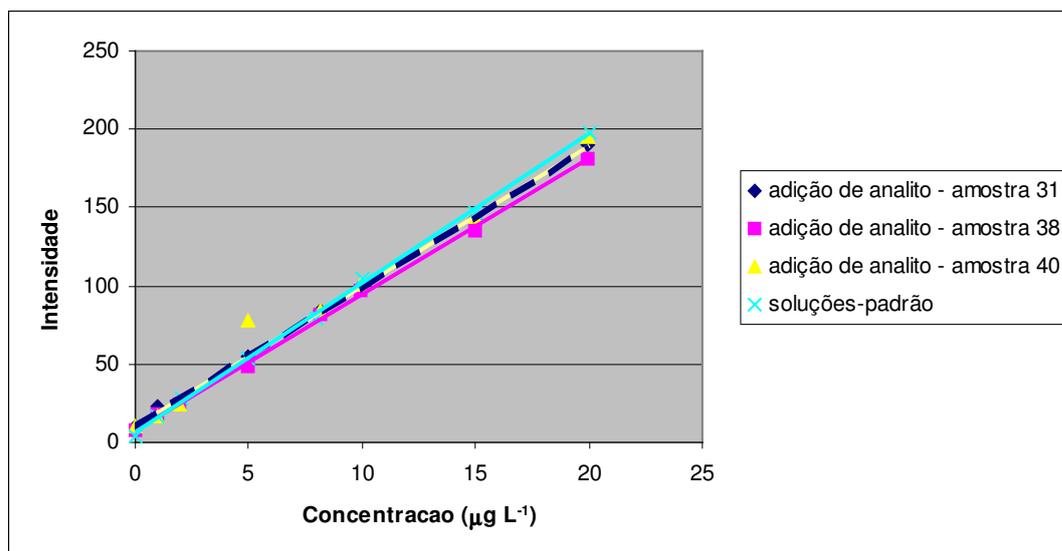


Figura 27. Gráfico de adição de analito usando a bÍlis dos peixes coletados em Itaipu.

O teste de adição de analito também foi usado para verificação da exatidão do método. Para tal, usando-se a curva analítica obtida para os padrões diluídos com solvente, foram calculadas as concentrações das amostras fortificadas com padrões e comparadas com a concentração esperada. Foi obtido uma média de concentração correspondente a 86% da concentração esperada, com valores variando de 81% a 93%.

Outra maneira de verificarmos a exatidão do método seria a análise de materiais certificados de referência. No entanto, apesar de Ariese e colaboradores (2005a, 2005b) terem desenvolvido materiais certificados de referência preparados com a bÍlis dos peixes *Platichthys flesus* (Linguado) e *Pleuronectes platessa* (Solha) coletados em locais considerados não-poluídos e expostos em laboratório a sedimentos contaminados e a óleo, respectivamente, este material ainda não está disponível para compra.

Além disso, a exatidão do método também poderia ser estudada pela comparação de resultados obtidos com outras técnicas já estabelecidas. No entanto, está é a primeira vez que estão sendo feitas determinações de HPAs em bÍlis de peixes coletados na Baía de Guanabara e não foi possível organizar um ensaio interlaboratorial a fim de comparar os resultados obtidos pela impossibilidade de organizar o teste no tempo disponível para a conclusão deste trabalho.

9.2. Comparação entre Baía de Guanabara e Itaipu

9.2.1. Parâmetros físico-químicos

Foram feitas 3 coletas na Baía de Guanabara e 3 coletas em Itaipu conforme o Quadro 7. A primeira coleta na Baía de Guanabara e a primeira coleta de Itaipu foram coletas de reconhecimento do local e os resultados obtidos não foram considerados para as conclusões desta dissertação.

Como em setembro de 2005 houve o derrame de 2.000 L de óleo na Baía de Guanabara que atingiu as praias da Flecha e Icaraí em Niterói, foi feita uma coleta de peixes em Itaipu para avaliar se houve alteração nos valores de metabólitos de HPAs medidos, em relação aos valores de agosto.

Quadro 7. Data e coordenadas da coletas.

Local	Data	Coordenadas	
Baía de Guanabara	16/02/2005	S 22° 44.696'	W 43° 11.483'
Itaipu	23/02/2005	S 22° 58.359'	W 43° 02.915'
Baía de Guanabara	10/08/2005	S 22° 44.654'	W 43° 11.496'
Itaipu	17/08/2005	S 22° 56.550'	W 43° 03.030'
Itaipu	06/09/2005	-	-
Baía de Guanabara	27/12/2005	S 22° 44.774'	W 43° 11.529'

Pelos parâmetros físico-químicos medidos nos locais de amostragem (Tabela 10) vemos que há uma grande diferença entre a transparência e turbidez da Baía de Guanabara e Itaipu, indicando que existe mais material particulado em suspensão na Baía de Guanabara do que em Itaipu. A condutividade de Itaipu é mais alta do que na Baía de Guanabara, como esperado, já que em Itaipu a água é salina e na Baía de Guanabara a água é salobra. Nota-se também o aumento da temperatura da água de ~11% no verão em relação ao inverno.

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos.

	Baía de Guanabara (fev/2005)	Itaipu (fev/2005)	Baía de Guanabara (ago/2005)	Itaipu (ago/2005)	Baía de Guanabara (dez/2005)
temperatura (°C)	27,0	26,0	23,8	23,2	26,1
pH	-	8,09	-	-	8,02
condutividade (mS cm ⁻¹)	-	52,8	-	41,8	33,8
oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	5,8	-	-	9,1	5,7
transparência (m)	0,66	2,70	0,64	3,78	0,66
turbidez (NTU)	11,7	4,2	17,4	0,38	-

9.2.2. Análise morfométrica dos peixes

Na Figura 28 encontra-se a distribuição de frequência do comprimento padrão dos indivíduos capturados na Baía de Guanabara e em Itaipu. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Anderson-Darling ($p = 0,394$). Houve maior incidência de indivíduos ($n=10$) na faixa de tamanho de 42 a 44 cm. Apenas na coleta de setembro de 2005, em Itaipu, foram coletados indivíduos com comprimento total menor que 35 cm (Figura 29), tamanho menor que o permitido pelo IBAMA (Portaria nº 73/2003). É importante ressaltar que esta foi uma coleta não programada, referente a um evento isolado decorrente de um derramamento de óleo que ocorreu acidentalmente em Itaipu. A intenção desta coleta foi aplicar a um caso real o método de determinação de metabólitos de HPAs em bÍlis de peixes.

Excetuando-se a coleta de setembro, houve predominância de machos nas demais coletas, correspondendo a 76% do total de indivíduos capturados (Tabela 11 e Figura 30). Yender e colaboradores (2002) relatam que o risco de exposição de peixes de estuário aumenta em áreas com menor profundidade e durante a época de desova. Apesar de não ser conclusivo, este fato explicaria a predominância de fêmeas observada somente nesta coleta.

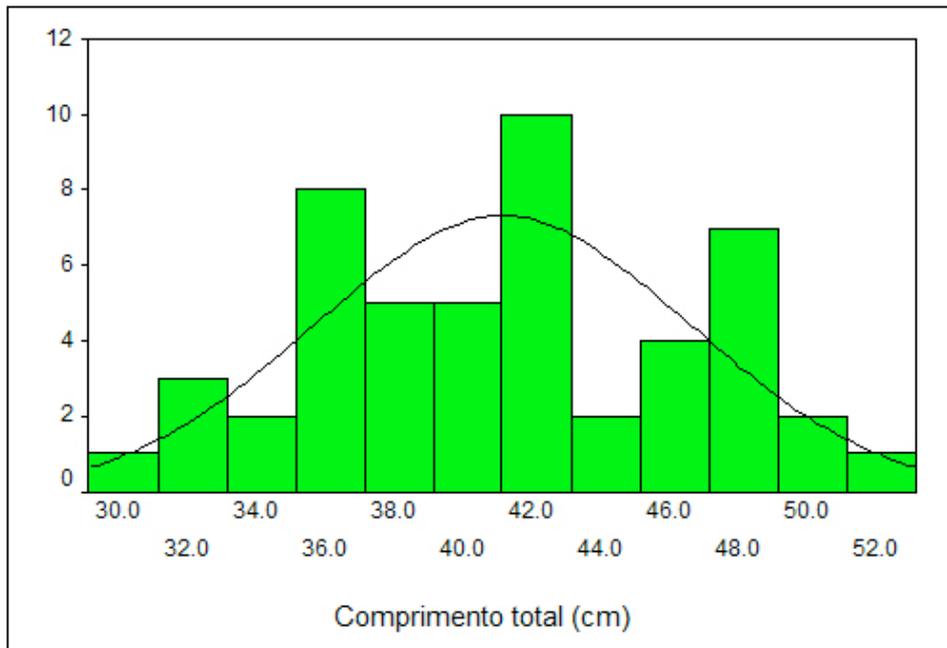


Figura 28. Distribuição de frequência do comprimento total dos indivíduos coletados

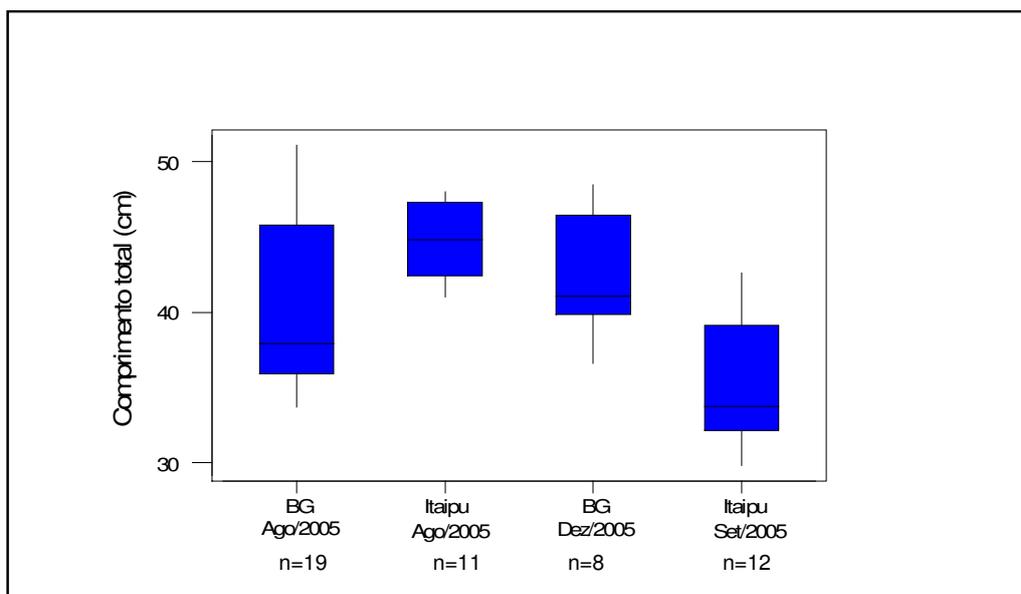


Figura 29. Gráfico de Boxplot do comprimento total, classificado por coleta (BG: Baía de Guanabara).

Tabela 11. Número de machos e fêmeas capturados.

Local	Mês	Macho	Fêmea	Total
Baía de Guanabara	Agosto/2005	17	2	19
Itaipu	Agosto/2005	6	5	11
Itaipu	Setembro/2005	3	5	8
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	12	0	12
Total		38	12	50

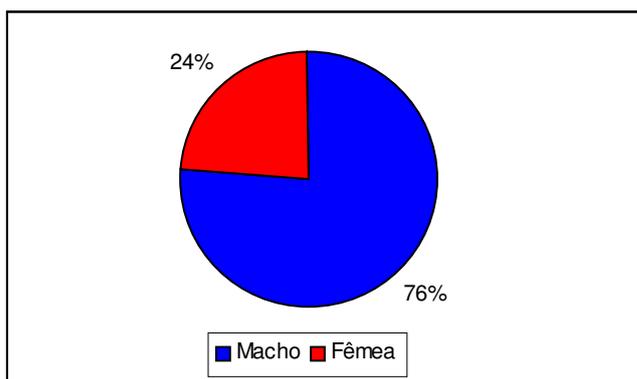


Figura 30. Proporção sexual dos indivíduos capturados em todas as coletas da Baía de Guanabara e Itaipu.

Apesar de estarem presentes em maior número, os machos, em média, são menores e pesam menos que as fêmeas (Tabela 12 e Tabela 13, Figura 31 e Figura 32).

Tabela 12. Estimativa da média do peso (kg) dos peixes coletados*.

Local	Mês	Macho	Fêmea	Total
Baía de Guanabara	Agosto/2005	0,520 ± 1,128	1,128 ± 0,045	0,584 ± 0,284
Itaipu	Agosto/2005	0,707 ± 0,102	0,813 ± 0,106	0,755 ± 0,113
Itaipu	Setembro/2005	0,308 ± 0,030	0,464 ± 0,124	0,406 ± 0,125
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	0,673 ± 0,216		0,673 ± 0,216
Total		0,581 ± 0,223	0,720 ± 0,272	0,614 ± 0,240

* média ± desvio-padrão

Tabela 13. Estimativa da média do comprimento total (cm) dos peixes coletados*.

Local	Mês	Macho	Fêmea	Total
Baía de Guanabara	Agosto/2005	39,329 ± 5,018	50,800 ± 0,283	40,537 ± 5,955
Itaipu	Agosto/2005	43,983 ± 2,301	45,560 ± 2,809	44,700 ± 2,546
Itaipu	Setembro/2005	32,183 ± 2,426	36,880 ± 4,452	35,119 ± 4,350
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	42,208 ± 3,895		42,208 ± 3,895
Total		40,409 ± 5,057	42,817 ± 6,412	40,987 ± 5,442

* média ± desvio-padrão

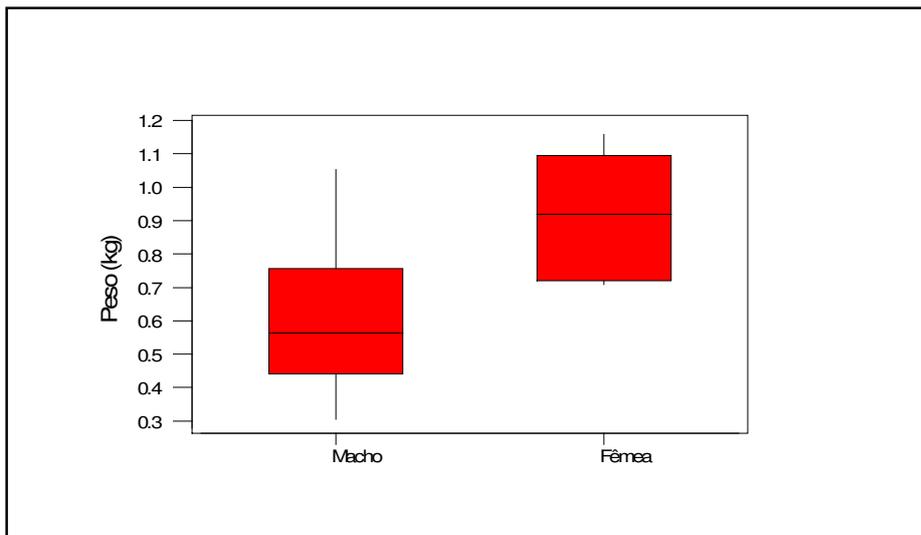


Figura 31. Gráfico de Boxplot do peso, classificado por sexo.

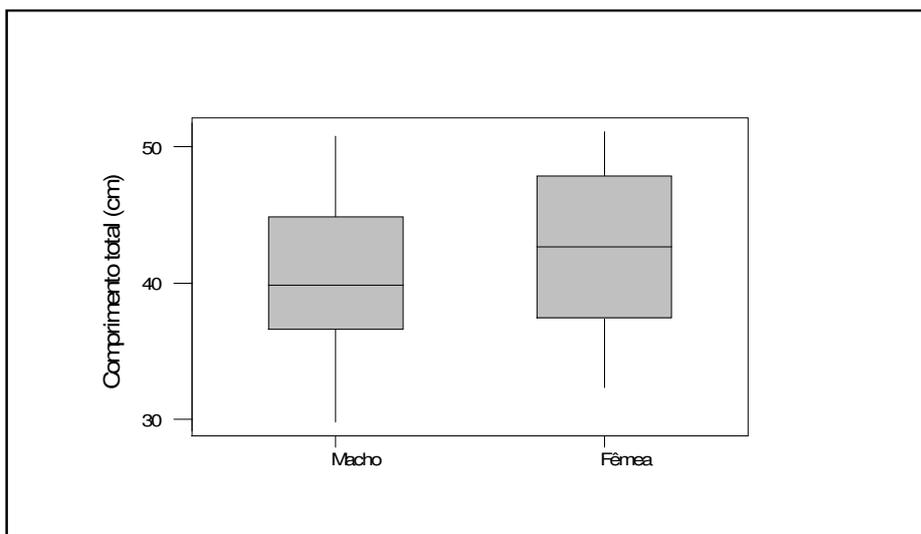


Figura 32. Gráfico de Boxplot do comprimento total, classificado por sexo.

Segundo Vazzoler (1996, in Costa, 2005) o valor do coeficiente angular de regressão entre peso total (W_T) e comprimento padrão (L_P) varia de 2,5 a 4,0. Pela equação 4 (seção 5.2.1.) foi calculado o modelo que relaciona W_T , a partir de L_P :

$$\hat{W}_T = 0,0354 \times L_P^{2,790}, \quad R^2 = 93,02\%$$

com ambas estimativas significativas e o valor de $p = 0,735$ para o pressuposto de normalidade dos resíduos. O valor de β foi 2,79, próximo de 3,0, valor característico de espécies que apresentam crescimento isométrico.

A partir do cálculo de β foi possível calcular o fator de condição (K) para cada indivíduo usando-se a equação 6 (5.2.2) (Quadro 8). Pela análise de variância dos dados não foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos para cada coleta (Tabela 14), indicando que os peixes coletados tinham mesmas condições de desenvolvimento. No entanto, é reportado que o fator de condição é variável durante o ciclo de maturidade sexual do indivíduo, reduzindo na época de reprodução, já que este pode ser influenciado, entre outros fatores, pela variação do peso das gônadas e estômago. Esta tendência foi vista neste trabalho nos peixes coletados na Baía de Guanabara em dezembro, época de reprodução observada para a *Mugil liza* (Oliveira, 1997).

Quadro 8. Estimativa das médias dos valores do fator de condição (K)*.

Local	Mês	K
Baía de Guanabara	Agosto/2005	0,037 ± 0,009
Itaipu	Agosto/2005	0,037 ± 0,003
Itaipu	Setembro/2005	0,039 ± 0,008
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	0,033 ± 0,003

* média ± desvio-padrão

Tabela 14. Análise de variância do fator de condição em relação as coletas.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Local	3	0,0001932	0,0000644	1,24	0,306
Erro	46	0,0023885	0,0000519		
Total	49	0,0025817			

9.2.3. Análise da bÍlis

Na Figura 33 observa-se a diferença entre os espectros da bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara e em Itaipu. Os espectros da Baía de Guanabara apresentam dois picos em 383 nm e 405 nm, respectivamente. Ariese e colaboradores, em seu artigo de 1993, reportam que o espectro da bÍlis do linguado (*Platichthys flesus*) também apresenta dois picos nos mesmos comprimentos de onda, que eles relacionaram com o espectro do metabólito 1-pireno-glicuronÍdeo padrão, principal metabólito da fase II da biotransformao do pireno. Os cálculos das concentraes de HPAs totais foi calculado a partir da altura dos picos em 383 nm, comprimento de onda otimizado para o pireno, e as concentraes são reportadas em equivalentes de pireno.

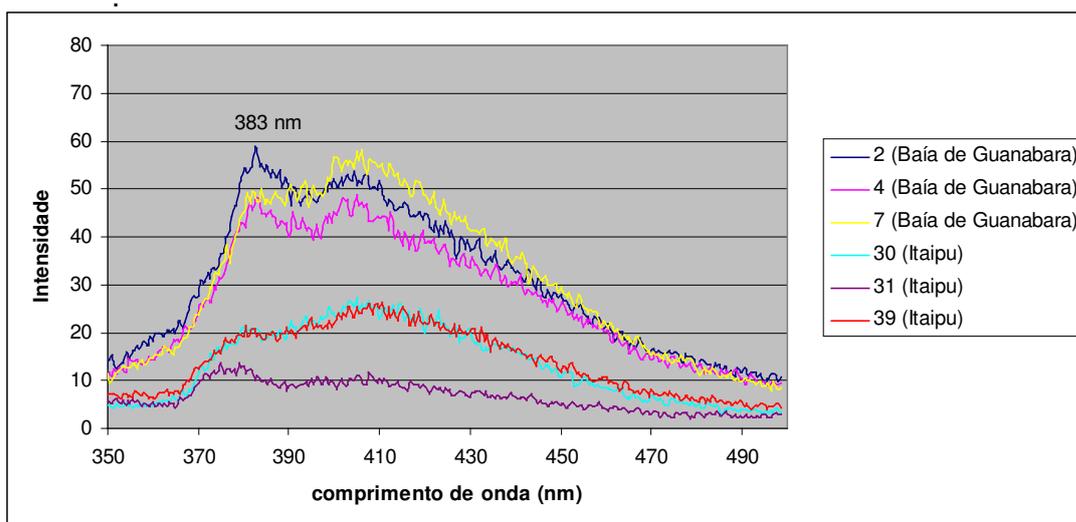


Figura 33. Espectros de emissão fluorescente das bÍlis diluídas da Baía de Guanabara e Itaipu.

O Quadro 9 apresenta as mdias das concentraes de HPAs na bÍlis dos peixes (*Mugil liza*) capturados em cada coleta, em relao ao sexo dos indivÍduos. Através da análise de variância verifica-se que não existe diferença significativa entre as mdias (Quadro 9, Tabela 15, Tabela 16, Tabela 17) e portanto, os dados serão tratados como um todo, sem a separao por sexo.

Quadro 9. Média da concentração de HPAs em mg L⁻¹ de equivalentes de pireno na bÍlis dos peixes (*Mugil liza*) capturados, separados por sexo*.

Local	Mês	Macho	Fêmea
Baía de Guanabara	Agosto/2005	7,4 ± 3,4 (n=17)	3,8 ± 0,7 (n=2)
Itaipu	Agosto/2005	1,8 ± 1,1 (n=6)	1,0 ± 0,4 (n=5)
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	10,4 ± 6,4 (n=12)	
Itaipu	Setembro/2005	1,7 ± 0,7 (n=3)	6,4 ± 3,3 (n=5)

* média ± desvio-padrão

Tabela 15. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta da Baía de Guanabara, agosto/2005.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Sexo	1	23,3	23,3	2,11	0,164
Erro	17	187,9	11,1		
Total	18	211,3			

Tabela 16. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta de Itaipu, agosto/2005.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Sexo	1	1,456	1,456	1,98	0,193
Erro	9	6,625	0,736		
Total	10	8,081			

Tabela 17. Análise de variância da média das concentrações de HPAs por sexo, coleta de Itaipu, setembro/2005.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Sexo	1	40,83	40,83	5,38	0,059
Erro	6	45,50	7,58		
Total	7	86,34			

No Quadro 10 são apresentadas as estimativas das médias das concentrações de HPAs na bÍlis dos peixes capturados em cada coleta e a Figura 34 apresenta a distribuição das medições em relação à mediana, mostradas na forma de boxplot. Medidas feitas na bÍlis diluídas de três peixes

coletados em Itaipu estavam abaixo do limite de detecção de $0,3785 \mu\text{g L}^{-1}$ e não foram utilizadas nos cálculos.

Quadro 10. Estimativa das médias das concentrações de HPAs (μg de equivalentes de pireno mL^{-1} de bile) por coleta*.

Local	Mês	HPAs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) equivalentes de pireno
Baía de Guanabara	Agosto/2005	$7,0 \pm 3,4$
Itaipu	Agosto/2005	$1,8 \pm 0,7$
Baía de Guanabara	Dezembro/2005	$10,4 \pm 6,4$
Itaipu	Setembro/2005	$4,6 \pm 3,5$

* média \pm desvio-padrão

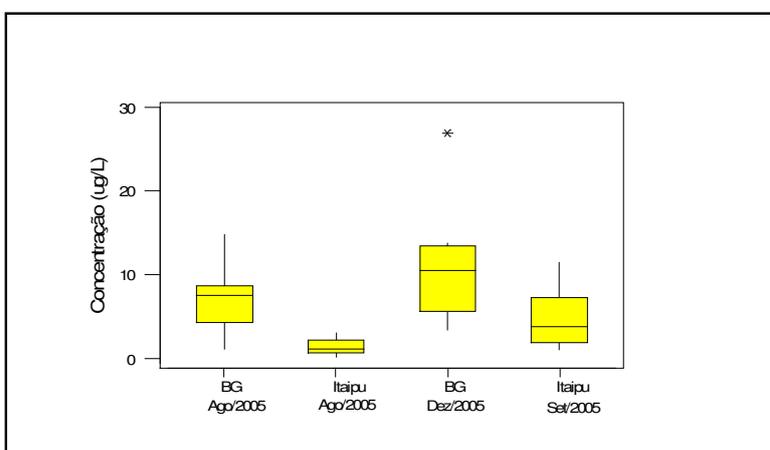


Figura 34. Gráfico de Boxplot da concentração de HPAs na bÍlis dos peixes, por coleta.

Pela análise de variância dos resultados obtidos nas diferentes coletas verificou-se que existe diferença significativa entre os valores medidos (Tabela 18).

Tabela 18. Análise de variância das concentrações de HPAs por coleta.

	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p
Local	3	2,8798	0,9599	12,11	0,000
Erro	43	3,4081	0,0793		
Total	46	6,2879			

Usando-se o teste de Tukey foi feita a comparação entre as médias par a par. Esta análise indicou que não existe diferença significativa, para um nível de confiança de 95%, entre os valores obtidos para a Baía de Guanabara nas diferentes estações do ano, inverno e verão.

Já comparando os valores obtidos para a Baía de Guanabara e Itaipu antes do derrame de setembro/2005, vemos que há diferença significativa, para um nível de confiança de 95%. Comparando os valores obtidos para Itaipu antes e depois do derrame vemos que também houve diferença significativa entre os resultados.

Assim, pelos resultados preliminares obtidos, pode-se dizer que o método utilizado foi capaz de diferenciar um local contaminado de um local não contaminado, tanto em casos de contaminação crônica (Baía de Guanabara) quanto em casos de contaminações acidentais (Itaipu, setembro/2005).

A comparação dos valores de concentração obtidos neste trabalho com os valores obtidos por outros autores fica prejudicada uma vez que os resultados são apresentados de formas distintas, além de, em muitas vezes, utilizarem metodologias e técnicas analíticas diferentes. O Quadro 11 apresenta o resultado de alguns trabalhos onde as concentrações são indicadas em equivalentes de 1-hidroxipireno. Verifica-se que os valores obtidos para os locais contaminados dos trabalhos de Lin e colaboradores (1994) e van der Oost e colaboradores (1994), encontram-se na mesma ordem de grandeza que os valores obtidos neste trabalho para os peixes coletados na Baía de Guanabara e em Itaipu após o derrame de setembro/2005.

Com o objetivo de tentar minimizar possíveis variações nas concentrações de HPAs pela concentração dos compostos presentes na biliar, de acordo com o tempo de jejum de cada peixe (*status alimentar*), alguns autores tentaram normalizar as concentrações de HPAs pela concentração de biliverdina ou proteína das amostras. No entanto, foi observado que não houve diminuição na covariância dos resultados e aumentando a incerteza dos resultados (Ariese *et al.*, 1997; Aas *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004). Ainda assim, recomenda-se que sejam feitas estas medições para fins comparativos. Neste trabalho foram feitas medições de absorvância em soluções de biliar diluídas em etanol 48% (1:100).

Quadro 11. Concentrações de HPAs em bÍlis de peixe em locais contaminados.

Peixe	Local	Concentração	Unidade	Referencia
FF				
<i>Ameiurus nebulosus</i>	Black river, rio que desemboca no Lago Erie (Grandes Lagos, EUA)	27,9 – 126,1	(µg mg proteÍna ⁻¹) equivalentes de naftaleno	Lin <i>et al.</i> , 1996
FS				
<i>Ameiurus nebulosus</i>	Black river, EUA.	2,63 – 19,5	(µg mLbÍlis ⁻¹) equivalentes de 1-hidroxipireno	Lin <i>et al.</i> , 1994
<i>Anguilla anguilla</i>	Lago Nieuwe Meer, Holanda	9,4 ± 7,2	(µg mL bÍlis ⁻¹) equivalentes de 1-hidroxipireno	van der Oost <i>et al.</i> , 1994
CLAE – F				
<i>Paralichthys californicus</i>	Marina del Rey, Califórnia, EUA	1,8 – 4,6	(µg mL bÍlis ⁻¹) equivalentes de benzo(a)pireno	Brown & Steinert, 2003
<i>Pleuronectes vetulus</i>	canal de Duwamish, Puget Sound, EUA	0,3-0,6	(µg mL bÍlis ⁻¹) equivalentes de benzo(a)pireno	Myers <i>et al.</i> , 1998

9.2.4. Análise por fluorescência - método sincronizado

Na fluorescência sincronizada, os comprimentos de onda de excitação e emissão são variados simultaneamente, com um intervalo fixo $\Delta\lambda$ ou ΔE , onde o máximo de sinal ocorrerá quando a varredura atingir o λ_{exc} .

Ariese e colaboradores (1993) recomendam que se use a análise de fluorescência sincronizada já que o espectro obtido tem bandas mais bem definidas do que o espectro obtido com a fluorescência fixa. Já Lin e colaboradores (1996) indicam, para a análise de metabólitos de HPAs em bÍlis de peixe, o uso da análise por fluorescência fixa por ser uma técnica mais simples do que a fluorescência sincronizada. Atualmente, vários fluormetros comercialmente disponíveis oferecem a possibilidade de registro deste tipo de espectro.

Aas e colaboradores (2000) ao estudarem os metabólitos presentes na bÍlis de peixes expostos a determinados HPAs individualmente (naftaleno, pireno e benzo(a)pireno) demonstraram que existem diferentes espectros para as diferentes classes de HPAs, usando-se o mesmo $\Delta\lambda$. Tendências espectrais

podem ser demonstradas com bÍlis de peixes expostos a HPAs de fontes petrogênicas e pirogênicas.

Neste trabalho, ao analisarmos as bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara, os espectros de fluorescência sincronizada mostraram que existem duas classes de HPAs presentes, com picos nos comprimentos de onda característicos de compostos com 2-3 anéis ($\lambda = 280$ nm) e 4 anéis ($\lambda = 332$ nm) (Figura 35). Não foi observado nenhum pico no comprimento de onda característico de HPAs com 5-6 anéis ($\lambda = 380$ nm). Estes resultados seriam um indÍcio de contaminação petrogênica já que a combustão incompleta de matéria orgânica dá origem preferencialmente a HPAs de alta massa molecular.

Este resultado é esperado já que a Baía de Guanabara recebe diariamente 7 toneladas de óleo (CEDAE, 199-) e está em concordância com estudos realizados por Lima (2001) em mexilhões da Baía de Guanabara, onde os HPAs predominantes foram fenantrenos alquilados e dibenzotiofenos, os quais destacam a origem, preferencialmente, petrogênica dos hidrocarbonetos presentes nos mexilhões.

No entanto, não se deve ignorar o aporte de HPAs provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica, que podem chegar à Baía de Guanabara por deposição atmosférica, já que o grau de contaminação atmosférico está diretamente relacionado com a urbanização, ao tráfego de veículos automotores e com a industrialização da área (Pereira Netto *et al.*, 2000) . HPAs de 5-6 anéis também foram detectados nos estudos em mexilhões feitos por Lima.

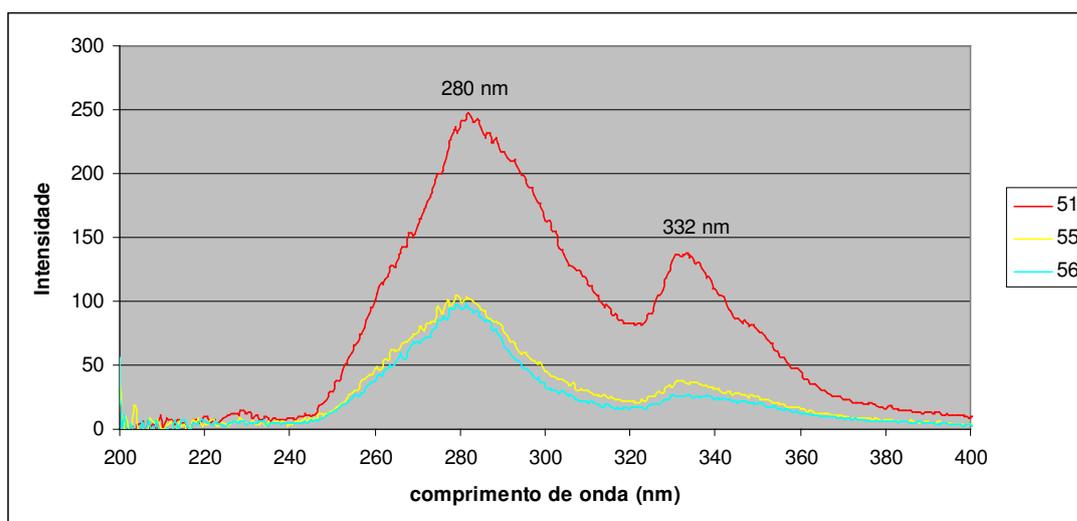


Figura 35. Espectro de fluorescência sincronizada ($\Delta\lambda=51$ nm) para bÍlis de peixes coletados na Baía de Guanabara.

9.2.5. Correlação entre as variáveis

As variáveis categóricas deste estudo foram codificadas de acordo com o Quadro 12 a seguir. O critério utilizado para categorização do local levou em consideração também o derramamento de óleo ocorrido em Niterói em setembro de 2005.

Quadro 12. Codificação das variáveis categóricas.

Sexo		Local		Cor da bÍlis	
Macho	1	Baía de Guanabara – Ago/2005	1	Verde musgo	1
Fêmea	2	Itaipu – Ago/2005	2	Marrom	2
		Baía de Guanabara – Dez/2005	3	Castanho	3
		Itaipu – Set/2005	4	Castanho claro	4

Assim, foi calculada a matriz de correlação das variáveis, onde é indicado o valor da correlação de Pearson entre cada variável e construído o dendograma de similaridade pelo método de Ward, utilizando distâncias euclidianas como medida de similaridade.

Pode-se observar na Tabela 19 e Figura 36 que são significativas as correlações entre o peso, comprimento padrão e comprimento total, de acordo com o crescimento isométrico calculado anteriormente. Houve também correlação positiva entre o peso, comprimento total e comprimento padrão com o volume de bÍlis, indicando que quanto maior o peixe maior a quantidade de bÍlis encontrada.

Tabela 19. Matriz de correlação das variáveis.

	W_T	L_T	L_P	K	volume	sexo	local	HPA	Absorvância	Cor
W_T	1									
L_T	0,921	1								
L_P	0,825	0,907	1							
K	0,293	-0,029	-0,254	1						
volume	0,603	0,606	0,500	0,066	1					
sexo	0,215	0,161	0,079	0,194	0,186	1				
local	-0,152	-0,235	-0,102	-0,022	-0,160	0,277	1			
HPA	0,081	0,004	0,070	0,018	0,191	-0,237	0,025	1		
Absorvância	-0,040	-0,109	-0,118	0,208	-0,021	0,158	0,143	0,567	1	
Cor	0,045	0,028	0,065	-0,038	-0,164	0,235	0,227	-0,488	-0,381	1

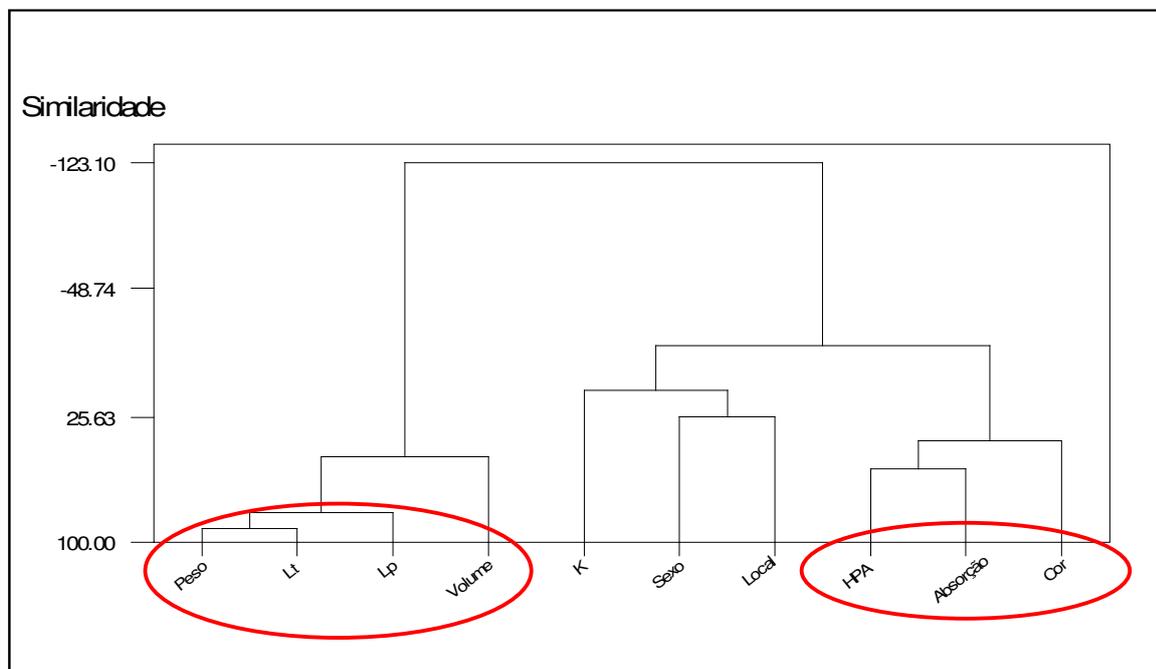


Figura 36. Dendrograma de similaridade dos valores absolutos das correlações absolutas das distâncias pelo método de Ward.

Além destas correlações, foram encontradas correlações entre o valor de absorvância em 380 nm, a cor da bÍlis e a concentração de HPAs medida, mostrando a relação que existe entre a maior densidade da bÍlis e concentrações maiores de HPAs, apesar de já ter sido demonstrado que normalizar as concentrações de HPAs pela concentração de biliverdina, medida por absorção molecular, não melhora a covariância dos resultados.

Uma preocupação neste trabalho era saber se o tipo de pesca teria influência no *status* alimentar do peixe, afetando a concentração de HPAs medida. Neste estudo o tipo de pesca usado na captura de peixes da Baía de Guanabara foi o curral. O curral tem formato externo circular com um prolongamento que sai de um ponto determinado e que serve para direcionar o peixe para dentro do curral, até serem retirados com uma rede. Já em Itaipu o tipo de pesca usado para captura dos peixes foi o arrasto de praia onde o pescado se acumula na rede durante o arrasto.

Dos peixes capturados na Baía de Guanabara, 50% apresentaram bÍlis com coloração verde musgo enquanto em Itaipu apenas 28% apresentaram esta mesma coloração, podendo indicar que os peixes que ficam presos no curral ficam maior tempo sem se alimentar. No entanto, estes dados não são conclusivos para se afirmar que há influência do tipo de pesca usado, curral ou arrasto, no *status* alimentar dos peixes capturados.

9.2.6. Determinação de HPAs totais em água

Para a análise de HPAs totais em água foi obtida uma curva analítica utilizando soluções de pireno em diclorometano. Para a elaboração da curva analítica foram utilizados 6 soluções-padrão com concentrações entre 10 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos pela diluição da solução estoque de pireno. Foram feitas 3 replicatas de cada concentração, obtendo-se a seguinte curva analítica (Figura 23):

$$\hat{Y}_c = 0,570 + 1,865 x, \quad R^2 = 99,80\% \quad (11)$$

($\pm 1,639$) ($\pm 0,020$)

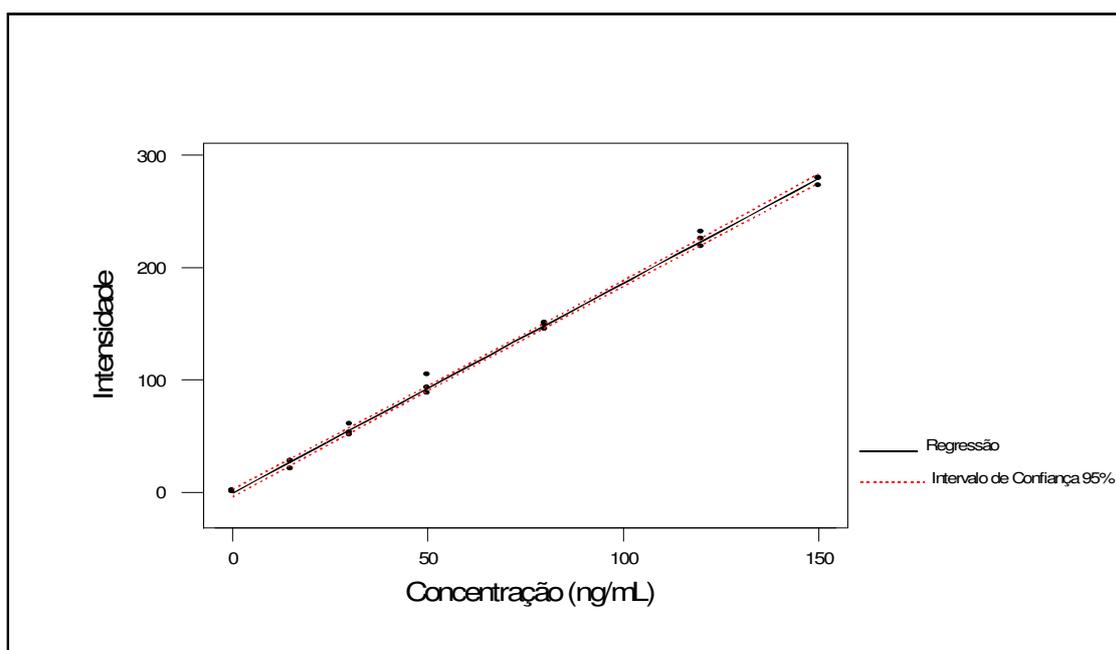


Figura 37. Curva analítica de soluções de pireno em diclorometano (n=3).

A Tabela 20 mostra a análise de variância da curva de regressão com $p = 0,000$. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância também foram testados apresentando $p=0,147$ e $p=0,131$ para a estatística teste de Anderson-Darling e Bartlett respectivamente.

A linearidade da curva foi testada pelo teste do ajuste do modelo linear (erro puro), sendo a faixa de trabalho considerada linear com $p = 0,788$.

Tabela 20. Análise de variância da curva de regressão.

Causa de variação	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	p
Regressão	1	194.532	194.532	8.684,66	0,000
Resíduo	19	426	22		
Total	20	194.958			

Como os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância foram válidos, o mínimo valor detectável referente à concentração, x_D , e o mínimo valor quantificável referente à concentração x_Q , podem ser obtidos pelas equações (13) e (14):

$$x_D = \frac{3,29\sqrt{22}}{1,865} = 8,274 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$x_Q = \frac{10\sqrt{22}}{1,865} = 25,15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

O mínimo valor detectável e o mínimo valor quantificável foram, respectivamente, $8,274 \mu\text{g L}^{-1}$ e $21,15 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os HPAs foram medidos em amostras de água do mar filtradas e não filtrada. No entanto, os extratos obtidos para a água do mar não filtrada encontravam-se intensamente coloridos, verdes, devido ao fitoplâncton presente nas amostras, interferindo nas análises por fluorescência. e os resultados foram expressos em equivalentes de pireno ($\mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 21). Foram preparados brancos do processo e seu valor de intensidade foi descontado do valor de intensidade obtido para as amostras.

Tabela 21. Concentração de HPAs medidos em amostras de água*.

Local	Data	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) equivalentes de pireno
Baía de Guanabara	agosto/2005	0,0921 \pm 0,0053
Itaipu	agosto/2005	0,0225 \pm 0,0164
Baía de Guanabara	dezembro/2005	0,1097 \pm 0,0009

* média \pm desvio-padrão

Os valores obtidos neste estudo, apesar de reportados em equivalentes de pireno, tiveram a mesma ordem de grandeza dos menores valores reportados por Azevedo (1998) e Meniconi e colaboradores (2002), que reportaram seus resultados em equivalentes de criseno (Quadro 13).

Quadro 13. Concentrações de HPAs na água da Baía de Guanabara.

Concentrações de HPAs	Unidade	Referência	Observações
0,06 – 1,59	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Silva, 2004	
0,66 – 1,18 (F)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Lima, 2001	amostras coletadas em 1999.
0,79 – 2,79 (NF)	equivalentes de criseno		
0,93 (F)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Lima, 2001	amostra coletada após o acidente de janeiro/2000.
1,52 (NF)	equivalentes de criseno		
<0,04 – 11,56 (NF)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Meniconi <i>et al.</i> , 2002	10 dias após o acidente de 2000.
	equivalentes de criseno		
0,05 – 1,09 (F)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Azevedo, 1998	
0,12 – 1,75 (NF)	equivalentes de criseno		
0,21 – 1,40 (F)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hamacher, 1996	
0,93 – 2,97 (NF)	equivalentes de criseno		

F: amostra filtrada; NF: amostra não filtrada