

8 Parte experimental

8.1. Coleta dos peixes e medição dos parâmetros físico-químicos

O peixe escolhido para monitoramento foi a tainha, especificamente da espécie *Mugil liza* já que junto com a corvina este é um dos peixes mais pescados na região da Praia de Ipiranga, Magé, RJ (IBAMA, 2002).

Os peixes foram coletados tanto em área de contaminação crônica por óleo (Baía de Guanabara, RJ) quanto em área sem histórico de contaminação, área controle (Itapu, Niterói).

Foram feitas duas amostragens iniciais, para reconhecimento dos pontos de coleta, na estação chuvosa (verão) em fevereiro/2005. Foram feitas mais três coletas, duas representando a estação seca (agosto/2005) e a outra representando a estação chuvosa (dezembro/2005). Também foi feita uma coleta em Itaipu, Niterói em setembro/2005, 4 dias após um derrame de óleo na entrada da Baía de Guanabara que atingiu as praias da Flecha e Icaraí em Niterói.

Na Baía de Guanabara os peixes foram capturados em currais localizados na região próxima a praia de Ipiranga, Magé, tendo suas coordenadas registradas em um GSP Garmin 12 (S22° 44', W43° 11'). Já os peixes da área controle foram capturados na praia de Itaipu, Niterói (S22° 56', W43° 03'), usando-se rede de espera ou arrasto de praia. Segundo a tábua das marés da Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha (DHN) para o Porto do Rio de Janeiro, as coletas foram feitas em maré baixa a enchente. Após a captura, os peixes foram conservados em gelo até a chegada no laboratório.

No local de amostragem foram feitas medições de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido usando-se uma sonda multi-parâmetros In-situ Troll 9000. A transparência foi medida com disco de Secchi. No laboratório foi feita a medição da turbidez usando um turbidímetro Alfa Tecnoquimica AT2K.

8.2. Amostragem dos peixes

Para evitar grandes variações de metabolismo e buscando maior repetitividade dos resultados foram selecionados peixes da mesma espécie e tamanhos semelhantes.

Pela semelhança entre as espécies de mugilídeos e para evitar que fossem usadas espécies diferentes foi feita a identificação de gênero e espécie das tainhas capturadas de acordo com o método de Menezes (1983). Para tal, foi verificada a presença de escamas na segunda nadadeira dorsal e na nadadeira anal. Em seguida, foram contadas as séries de escamas laterais que deveriam estar presentes em número de 29 a 34. Um indivíduo de cada local de coleta foi retirado para ser analisado por técnicos do setor de Ictiologia do Museu Nacional (UFRJ) para confirmação da espécie e para ser guardado como testemunho. O tamanho mínimo de captura foi 35 cm, tamanho permitido pelo IBAMA (portaria nº 73/2003), até 51 cm.

Após a identificação das espécies foram feitas medições morfométricas (comprimento total, comprimento padrão, comprimento da cabeça, altura da cabeça) utilizando-se um ictiômetro e um paquímetro calibrados pela Rede Brasileira de Calibração (RBC) e foi medido também o peso dos peixes utilizando-se uma balança analítica.

Em seguida, os peixes foram abertos para dissecação (Figura 18), sendo feita a identificação do sexo de cada indivíduo (Figura 19). Após a localização da vesícula biliar (Figura 20) foi retirado o líquido biliar com o auxílio de uma seringa (Figura 21). A bÍlis foi estocada em geladeira (10 °C) até que todos os indivíduos fossem abertos e seu líquido biliar retirado, para em seguida proceder as diluições e análises.



Figura 18. Abertura do indivíduo.

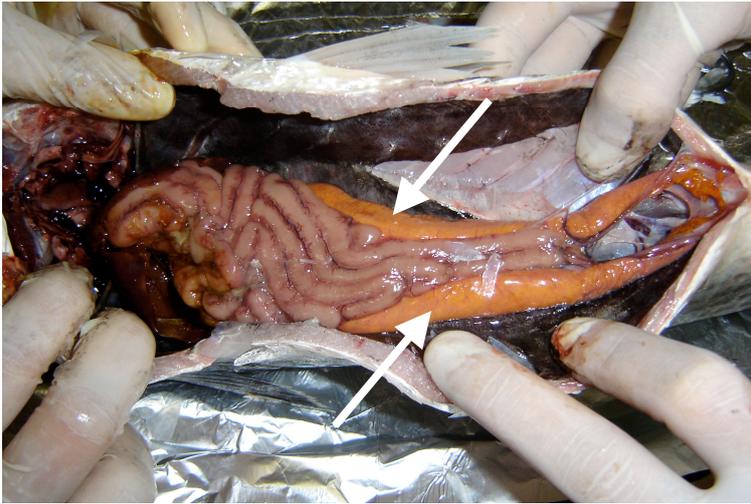


Figura 19. Identificação do sexo do peixe pela análise visual das gônadas, neste caso, fêmea.



Figura 20. Localização da vesícula biliar.



Figura 21. Retirada do líquido biliar.

8.3. Análise da bÍlis

8.3.1. Escolha do sistema solvente

O solvente comumente usado para diluição da bÍlis para determinação de metabÓlitos de HPAs por fluorescência é o etanol diluído em água na proporção 48:52 v/v (Ariese *et al.*, 1993, Lin *et al.* 1994, Aas *et al.*, 2000). Com o objetivo de avaliar o desempenho de outros sistemas solvente na presença de HPAs foi feito um planejamento experimental usando-se os solventes Etanol P.A. Merck, Propanol P.A. Merck e água deionizada. As proporções solvente/água usadas foram 25:75 v/v, 48:52 v/v e 75:25 v/v. Metanol não foi testado devido a sua alta toxicidade. Solventes apolares também não foram testados já que a bÍlis é composta principalmente por água.

O HPA utilizado como referência foi o Pireno da Sigma (St. Louis, EUA) com 97% de pureza. Apesar de o benzo[a]pireno ser o HPA mais estudado já que foi o primeiro HPA a ter seu potencial carcinogênico reconhecido, os HPAs menores são absorvidos, metabolizados e excretados em maior quantidade (Krahn *et al.*, 1987). No caso do pireno, o metabÓlito de interesse é o 1-hidroxipireno, principal metabÓlito formado pelas reações de FASE I da sua biotransformação. No entanto, este padrão não estava disponível durante o período deste trabalho devido a dificuldades de importação.

Devido a sua alta hidrofobicidade, a solubilização do pireno em etanol/água exige agitação vigorosa, sendo testada também a influência no tempo de agitação no ultra-som utilizado durante o preparo das soluções estoque.

A partir de soluções estoque independentes foram preparados padrões em duplicata e sua análise feita no espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 Luminescence Spectrometer. Foram usadas bandas espectrais de passagem de 4 nm para excitação e emissão e cubetas de quartzo, em todas análises. A detecção foi feita no comprimento de onda de excitação de 341 nm e o comprimento de onda de emissão variou de 350 nm a 450 nm, de acordo com o descrito na literatura (Ariese *et al.*, 1993, Lin *et al.* 1994, Aas *et al.*, 2000).

8.3.2.

Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Após a escolha do sistema solvente, foram otimizados os comprimentos de onda de excitação e emissão através da análise dos espectros com comprimento de onda de emissão fixo, variando o comprimento de onda de excitação de 200 nm até 400 nm. Assim, é possível verificar qual o comprimento de onda de excitação dá a melhor resposta de intensidade de sinal.

8.3.3.

Curva analítica

A curva analítica foi obtida com 8 pontos, incluindo o branco, com soluções padrão diluídas na faixa de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas a partir de uma solução estoque de pireno em etanol/água 48% de concentração de aproximadamente 10 mg L^{-1} . Foram feitas quatro replicatas de cada ponto. Foram feitas também curvas de adição padrão com amostras de bÍlis diluídas (1:2000).

8.3.4.

Absorção molecular

A fim de ter uma referência do *status* alimentar dos peixes coletados, vários autores indicam que deve ser feita a medição da concentração de biliverdina através de medições de absorção molecular (Ariese *et al.*, 1997; Aas *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004). De acordo com estes autores, foram preparadas soluções de bÍlis diluídas em etanol 48% (1:100 v/v) e as absorvâncias medidas em 380 nm, em um espectrofotômetro UV-Visível DMS-100 Intralab.

8.3.5. Estudo do efeito de matriz

Com o objetivo de analisar se a concentração da amostra pode interferir na análises por fluorescência foram feitas quatro diluições diferentes para algumas amostras de bÍlis (1:2000, 1:1500, 1:1000, 1:500). Foram então feitas medições da transmitância das amostras diluídas em um espectrofotômetro Spec 20 MV Coml. Indl. Dourado Ltda. no comprimento de onda de 332 nm.

A fim de observar se havia influência da densidade da bÍlis devida aos diferentes *status* alimentar dos peixes coletados foram escolhidas 5 amostras com cores variando do marrom ao verde musgo e valores diferentes de absorvância.

8.3.6. Determinação de HPAs total por fluorescência na bÍlis de peixe

Antes das medições de fluorescência as amostras de bÍlis foram diluídas 1:2000 em etanol 48% a fim de obter uma amostra suficientemente transparente (Ariese *et al.*, 1993). A detecção foi feita no comprimento de onda de excitação de 332 nm e o comprimento de onda de emissão variou de 350 nm a 450 nm. Foi usada uma curva analítica feita com padrões de pireno em etanol 48% na faixa de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo os resultados reportados em mg de equivalente de pireno L^{-1} .

Além do comprimento de onda de excitação de 332 nm, otimizado para o pireno (4 anéis), foram feitas leituras nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 290/335 nm e 380/430 nm. Estes comprimentos de onda são recomendados na literatura para a análise do grupo de HPAs de 2-3 anéis e 5-6 anéis, respectivamente.

Foram feitas também leituras onde os comprimentos de onda de excitação e de emissão variavam simultaneamente, com um intervalo fixo de comprimento de onda ($\Delta\lambda$). A varredura sincronizada pode fornecer espectros de fluorescência bem característicos, dependendo do metabólitos de HPAs presentes.

8.3.7. Limpeza do material

Toda a vidraria volumétrica e os frascos usados para o armazenamento do líquido biliar foram lavados com detergente (Detertec 3%) e enxaguada com água. Em seguida, todo o material foi enxaguado três vezes com água deionizada e rinsado com etanol 48%.

8.4. Análise de HPAs totais em água

8.4.1. Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Como os padrões usados na análise de HPAs totais em água são preparados com o solvente diclorometano Mallinckrodt (grau HPLC) foi necessário otimizar os comprimentos de onda de excitação e emissão que dão a melhor resposta para o novo solvente. Foram analisados os espectros de emissão, com o comprimento de onda de emissão fixo, variando o comprimento de onda de excitação de 200 nm até 400 nm.

8.4.2. Curva analítica

A curva analítica foi obtida com 8 pontos, incluindo o branco, com soluções padrão diluídas na faixa de 10 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas a partir de uma solução estoque de pireno em diclorometano de concentração de aproximadamente 10 mg L^{-1} . Foram feitas triplicatas de cada ponto.

8.4.3. Coleta de água

As amostras foram coletadas com o auxílio de uma garrafa coletora de acrílico de 1 L, a cerca de 50 cm abaixo da superfície e transferidas para garrafas de vidro previamente limpas. Parte da amostra inicial foi usada para rinsar a garrafa e desprezada em seguida. As amostras foram conservadas em gelo até a chegada ao laboratório.

8.4.4. Extração de HPAs totais

Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, foi feita a extração dos HPAs segundo a metodologia adaptada do International Oceanographic Commission (IOC-UNESCO) (1984). Foi realizada a filtração de parte das amostras devido a grande quantidade de plâncton presente nas mesmas. Um litro da amostra de água filtrada foi transferida para funil de separação de 2 L, onde foram adicionados 50 mL de Diclorometano (Tedia grau HPLC), sendo a extração dos HPAs foi feita por agitação manual durante 5 minutos. Após a separação das fases, a fase orgânica foi recolhida em balão de vidro de fundo chato e armazenada em local abrigado de luz.

Em seguida, realizou-se nova extração adicionando-se mais 50 mL de diclorometano que foi recolhida no mesmo frasco que o primeiro extrato. O extrato obtido foi centrifugado durante 3 minutos para separar a emulsão formada durante a agitação devido a grande quantidade de matéria orgânica presente na amostra, do diclorometano. Foi adicionado sulfato de sódio para a quebra da emulsão e centrifugado novamente (Petrobrás, 200?).

O extrato final obtido foi concentrado em evaporador rotatório, à pressão reduzida de 200 mmHg e temperatura de aproximadamente 36 °C. O concentrado obtido foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e avolumado com diclorometano.

8.4.5. Determinação de HPAs total por fluorescência em água

A análise de fluorescência para determinação de HPAs totais foi realizada em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 Luminescence Spectrometer. A banda espectral de passagem foi de 4 nm para excitação e emissão e foram usadas cubetas de quartzo em todas as análises. A detecção foi feita no comprimento de onda de excitação de 334 nm e o comprimento de onda de emissão foi variado de 350 a 450 nm. Foram feitos brancos do processo usando-se água do mar artificial, preparada de acordo com a recomendação de Riley & Shirrow (1975), a qual passou pelo mesmo processo de extração das amostras.

8.4.6. Limpeza do material

Toda a vidraria volumétrica e os funis de separação foram lavados com detergente (Detertec 3%) e enxaguada com água. Em seguida, todo o material foi enxaguado três vezes com água destilada seguida de rinsagem com acetona. Após seco, todo o material foi rinsado com diclorometano.

8.5. Análise estatística dos dados

Para a escolha do melhor sistema solvente para a diluição das amostras foi usado o Planejamento Fatorial, modelo 2^3 , onde foram escolhidos 3 fatores diferentes para estudo, em dois diferentes níveis. Pela análise de variância (ANOVA) dos resultados, os efeitos que apresentam valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos. Foram também testadas a normalidade dos resíduos usando o teste de Anderson-Darling e a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett já que para o uso da ANOVA as premissas de normalidade e homocedasticidade não podem ser violadas.

Para a análise dos parâmetros de desempenho analítico a curva analítica foi construída usando-se o método dos mínimos quadrados. Pela análise de variância testou-se a validade da regressão. Foram também testadas a

normalidade usando o teste de Anderson-Darling e a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett.

Para a análise morfométrica dos peixes foram construídos gráficos de boxplot onde são mostrados os valores extremos (máximo e mínimo) dos dados, e sua mediana.

Para comparação dos dados obtidos para os metabólitos de HPAs da biliar dos peixes da Baía de Guanabara e Itaipu foi usada a análise de variância onde a hipótese a ser testada, H_0 , seria aceita se os valores de $p < 0,05$. A rejeição da H_0 leva a aceitação da hipótese H_1 . Neste caso, a hipótese H_0 corresponde à hipótese de que as médias dos resultados da Baía de Guanabara e de Itaipu são iguais:

$$H_0: \mu_{\text{Baía de Guanabara}} = \mu_{\text{Itaipu}}$$

$$H_1: \mu_{\text{Baía de Guanabara}} \neq \mu_{\text{Itaipu}}$$

A fim de atender ao critério de homogeneidade de variância foi necessário transformar os dados usando o logaritmo na base 10. A comparação das médias foi feita usando o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.