

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA MUSSOI GIACOMIN

AVALIAÇÃO DA 7-*etoxiresorufina-O-desetilase* (EROD) COMO BIOMARCADOR  
DE CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS  
NA LAGOA DOS PATOS - RS

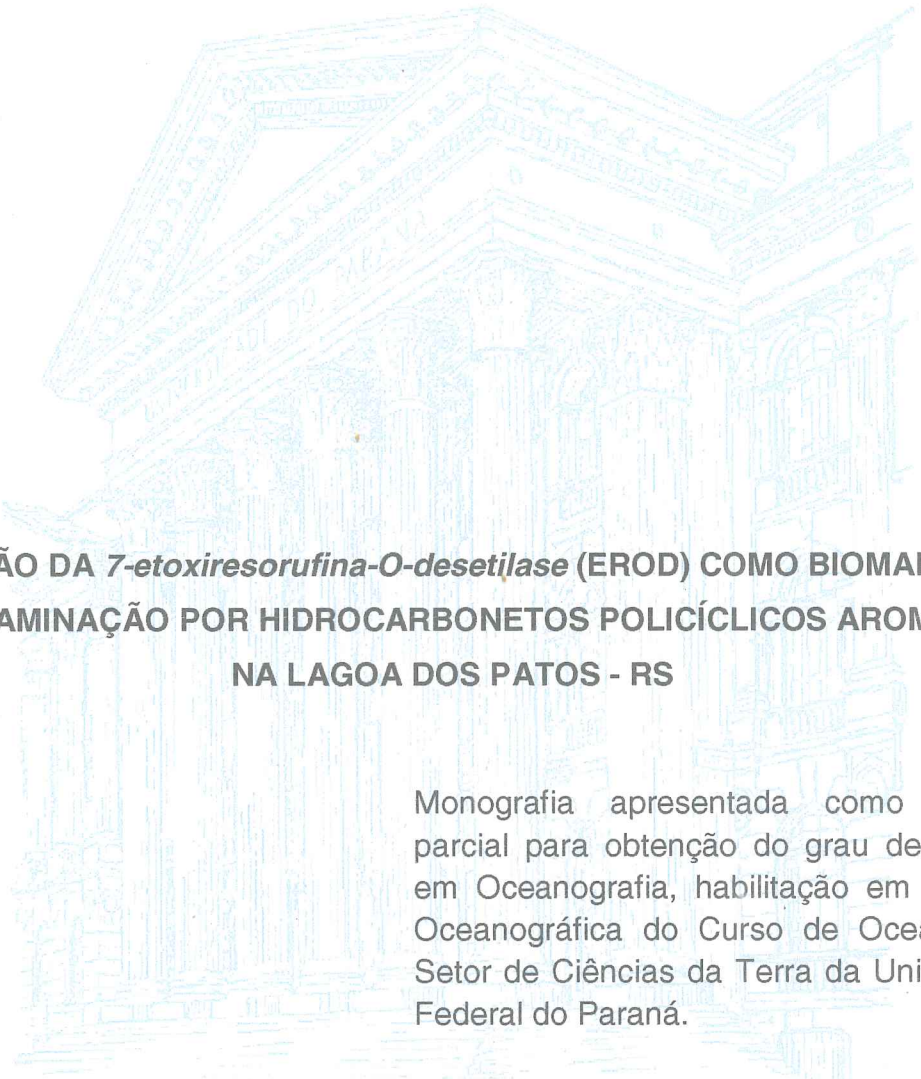
UFPR - Centro de Estudos do Mar  
BIBLIOTECA

PONTAL DO PARANÁ  
2010

M  
2010-11

M 30.10 11

MARINA MUSSOI GIACOMIN



**AVALIAÇÃO DA *7-etoxiresorufina-O-desetilase* (EROD) COMO BIOMARCADOR  
DE CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS  
NA LAGOA DOS PATOS - RS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Oceanografia, habilitação em Pesquisa Oceanográfica do Curso de Oceanografia, Setor de Ciências da Terra da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

PONTAL DO PARANÁ  
2010

## TERMO DE APROVAÇÃO

Marina Mussoi Giacomini

**“Avaliação da 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) como biomarcador de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na Lagoa dos Patos-RS”**

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
Prof. Dr. Francisco Filipak-Departamento de Biologia celular/UFPR

  
Prof. Dr. Henry Louis Spach-CEM/UFPR

  
Prof. Dr. Adalto Bianchini-Instituto Ciências Biológicas/FURG  
Presidente

Pontal do Paraná, 08 de dezembro de 2010.

*Aos meus pais, minha irmã e especialmente  
à minha avó Josephina Giacomini (in memoriam),  
simplesmente por existirem.*

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho:

Aos meus Pais, Antonio e Neli, que durante todo o período da faculdade não mediram esforços para estar sempre ao meu lado, em todas as horas que eu precisei.

À minha irmã, Renata, pelos momentos mais engraçados, por todas as vezes que leu meus os meus trabalhos, por toda ajuda, enfim... por tudo!

À Camila M.G. Martins, que foi a pessoa responsável pela minha entrada no mundo científico, que sempre com muita paciência me ensinou muito do que eu sei hoje, e que despertou em mim a paixão pela toxicologia.

À coordenação do curso de Oceanografia da UFPR, por toda ajuda burocrática no pré e pós mobilidade acadêmica, em especial ao Maurício Camargo e a D. Izis.

À UFPR e a FURG, pela oportunidade da mobilidade acadêmica, que me permitiu expandir os conhecimentos, os horizontes, as amizades, e transformou o que hoje eu chamo de presente.

Ao CONECO, principalmente e especialmente à Pati Costa, por tantos dias gastos me ajudando com o meu trabalho! Obrigada Pati.

À todo o pessoal do ICB, todos que sempre me ajudaram, não só com esse trabalho, mas sempre que eu precisei.

Aos meus amigos de Chopinzinho, que sempre fizeram das minhas férias, mesmo que curtas, as melhores!!

À minha companheira de casa, Andréia, por esses 5 ótimos anos de muita alegria! Às minhas outras companheiras de casa, Camila e Marília, que me acolheram e até hoje estão comigo sempre que preciso.

À todos os amigos, os novos e os antigos.

Ao INCT-Toxicologia Aquática, pela bolsa de iniciação científica, ao CTHidro pelo apoio ao projeto.

Ao meu orientador, Profº. Adalto Bianchini, por to do o apoio e confiança que depositou em mim, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos professores, Francisco Filipak e Henry Spach, por aceitarem participar da banca.

**Muito Obrigada!!!**

*Did you ever know that you're my hero  
And everything I would like to be  
I can fly higher than an eagle  
Cause you are the wind beneath my wings.*

*It might have appeared to go unnoticed  
but I've got it all here in my heart  
I want you to know, I know the truth, yes I do  
I would be nothing without you.*

Jeff Silbar e Larry Henley, 1982

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) como biomarcador de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em três espécies de relevante importância ecológica e econômica na região estuarina da Lagoa dos Patos – RS. Exemplares do peixe *Micropogonias furnieri*, do siri azul *Callinectes sapidus* e do copépode *Acartia tonsa* foram coletados sazonalmente (primavera, verão, outono e inverno), em cinco diferentes pontos do estuário com graus de contaminação distintos. A atividade da EROD e a concentração de HPAs foram analisadas em fígado e hepatopâncreas de *M. furnieri* e *C. sapidus*, respectivamente, bem como em *pools* de copépodes inteiros. Os dados da EROD foram correlacionados com as concentrações de HPAs nos tecidos, com os dados biológicos e também com os parâmetros abióticos (salinidade, temperatura e pH). Os maiores valores encontrados para atividade da EROD correspondem aos meses do inverno (244,98  $\mu\text{mol resorufina}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ ) para *M. furnieri*, e ao outono para *C. sapidus* e *A. tonsa* (325,35 e 25,99  $\mu\text{mol resorufina}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ , respectivamente). Para as três espécies estudadas, o somatório dos HPAs encontrados foi maior nos meses do inverno e outono, sendo que o siri azul *C. sapidus* apresentou as maiores concentrações (361,61  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  peso úmido). A composição dos HPAs encontrados nos tecidos foi mista, ou seja, não houve predominância de compostos de alto ou baixo peso molecular. Os compostos de alto peso molecular apresentaram boa correlação ( $r=0,6$ ) com a atividade da EROD em *M. furnieri*, no entanto, os de baixo peso molecular não apresentaram resultados significativos. A partir destes resultados pode-se afirmar que a EROD é um bom biomarcador de contaminação aquática por hidrocarbonetos de alto peso molecular. Nas outras espécies estudadas, a atividade da EROD apresentou melhor correlação com as variáveis abióticas, indicando que esses parâmetros podem afetar a atividade da CYP1A e influenciar a biotransformação de xenobióticos.

**Palavras-chave:** 7-etoxiresorufina-O-desetilase, HPAs, biomarcador, Lagoa dos Patos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase as a biomarker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in three species of significant ecological and economic importance in Patos Lagoon estuary - RS. Specimens of the fish *Micropogonias furnieri*, blue crab *Callinectes sapidus* and copepod *Acartia tonsa* were collected seasonally (spring, summer, autumn and winter) in different sites of the estuary with different degrees of contamination. EROD activity and PAH concentrations were measured in liver and hepatopancreas of *M. furnieri* and *C. sapidus*, respectively, as well as in pools of whole copepods. For analysis of "efficiency" of the biomarker, the EROD data were correlated with the concentrations of PAHs, with biological data and also with the abiotic parameters. The higher values of EROD activity occurred in winter for *M. furnieri* (244.98  $\mu\text{mol resorufin}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg of protein}^{-1}$ ) and in autumn for *C. sapidus* and *A. tonsa* (325.35 and 25.99  $\mu\text{mol resorufin}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg of protein}^{-1}$ , respectively). For the three species studied, the amount of PAHs was higher in autumn and winter, and the blue crab *C. sapidus* had the highest concentrations (361.61  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight). There were no predominance of compounds with high or low molecular weight. In *M. furnieri* the high molecular weight compounds had good correlation ( $r = 0.6$ ) with EROD activity, indicating that this parameter is a good biomarker of PAH exposure. However, correlation with the low molecular weight compounds was not significant. In the other species, EROD activity showed correlation with abiotic variables, indicating that abiotic parameters can affect the CYP1A1 activity and influence biotransformation of xenobiotics.

Key-words: 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase, PAHs, biomarker, Patos Lagoon.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Região estuarina da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) e pontos de coleta das amostras (1- Ilha dos Marinheiros; 2- Saco do Justino; 3- Yatch Club; 4- Saco da Mangueira; 5- Canal de Acesso ao Porto de Rio Grande). Adaptado de: ANDRADE, 2005. ....25
- Figura 2: Fluxograma da análise de HPAs em tecidos animais. ....28
- Figura 3: Cromatografia no modo *Full Scan* com os tempos de retenção e íons característicos representativos dos padrões externos de HPAs (500 ng.mL<sup>-1</sup>) .....30
- Figura 4: Atividade da EROD no hepatopâncreas de *Callinectes sapidus* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ....34
- Figura 5: Atividade da EROD no fígado de *Micropogonias furnieri* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ....35
- Figura 6: Atividade da EROD em *Acartia tonsa* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). .....35
- Figura 7: Concentração de HPAs no fígado de *Micropogonias furnieri* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ....36
- Figura 8: Concentração de HPAs em hepatopâncreas de *Callinectes sapidus* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ....37
- Figura 9: Concentração de HPAs em *pools* de *A. tonsa* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). 37
- Figura 10: Concentração de HPAs no fígado de *Micropogonias furnieri*, em diferentes estações do ano. ....38

- Figura 11: Concentração de HPAs no hepatopâncreas de *Callinectes sapidus*, nas diferentes estações do ano.....39
- Figura 12: Concentração de HPAs em pools de *Acartia tonsa*, em diferentes estações do ano. ....39
- Figura 13: Relação entre a atividade hepática da EROD e o comprimento padrão em *Micropogonias furnieri* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,159$ ).....43
- Figura 14: Relação entre a atividade hepática da EROD e o pH da água em *Micropogonias furnieri* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,35$ ).....44
- Figura 15: Relação entre a atividade hepatopancreática da EROD e a temperatura da água em *Callinectes sapidus* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,21$ ) Breakpoint = 22,80°C. ....44
- Figura 16: Relação entre a atividade corporal da EROD e a salinidade da água em *Acartia tonsa* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,28$ ). ....45
- Figura 17: Relação entre a atividade hepática da EROD e a concentração de HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos em *Micropogonias furnieri* ( $p < 0,05$  e  $r = 0,60$ ). 46

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Principais fontes de hidrocarbonetos de petróleo para o ambiente marinho.<br>.....  | 13 |
| Tabela 2: Número de anéis, massa molecular, coeficiente de partição octanol-água (LogKow) e carcinogenicidade dos 16 HPAs considerados prioritários para estudo pela USEPA..... | 15 |
| Tabela 3: Trabalhos que confirmam a indução da EROD em estudos de campo.....  | 19 |
| Tabela 4: Parâmetros físico-químicos da água mensurados nos locais de amostragem no momento das coletas dos animais.....  | 32 |
| Tabela 5: Biometria dos animais coletados em diferentes estações do ano.....  | 33 |
| Tabela 6: Percentual de HPAs de 2-3 anéis e de 4-6 anéis aromáticos em relação a quantidade de HPAs totais encontrados nas 3 espécies estudadas nas 4 estações do ano. ....     | 40 |
| Tabela 7: Regressão múltipla entre a variável dependente EROD e as variáveis independentes mensuradas.....  | 41 |
| Tabela 8: Regressão múltipla entre a variável dependente EROD e as variáveis independentes mensuradas (HPAs de 2 e 3 e 4 a 6 anéis aromáticos).. ....                           | 42 |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO.....   | 12 |
| 1.1   | Hidrocarbonetos: origem, interação e efeitos no ambiente marinho .....                    | 13 |
| 1.2   | Biomarcadores .....   | 17 |
| 1.2.1 | A Família CYP1A e a 7-Etoxiresorufina O-desetilase (EROD) .....                           | 18 |
| 1.3   | Caracterização das espécies monitoras .....   | 19 |
| 1.3.1 | O copépode <i>Acartia tonsa</i> .....   | 20 |
| 1.3.2 | O siri-azul <i>Callinectes sapidus</i> .....  | 20 |
| 1.3.3 | A corvina <i>Micropogonias furnieri</i> .....   | 21 |
| 2     | OBJETIVOS.....  | 22 |
| 3     | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 23 |
| 3.1   | Área de Coleta .....  | 23 |
| 3.2   | Coleta dos Animais .....  | 25 |
| 3.3   | Análise da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD).....                                     | 27 |
| 3.4   | Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em material biológico..... | 27 |
| 3.4.1 | Limpeza do Material.....  | 27 |
| 3.4.2 | Procedimento Analítico .....  | 28 |
| 3.5   | Análises Estatísticas.....  | 31 |
| 4     | RESULTADOS .....  | 32 |
| 4.1   | Dados Biológicos e Parâmetros Abióticos .....   | 32 |
| 4.2   | Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase .....   | 33 |
| 4.3   | Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em material biológico..... | 36 |
| 4.4   | Relação entre a atividade da EROD e a concentração de HPAs.....                           | 40 |
| 5     | DISCUSSÃO.....  | 47 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 53 |

## 1 INTRODUÇÃO

A zona costeira é definida como a faixa de transição entre o continente e o oceano, abrangendo alguns dos mais produtivos e valorizados habitats da biosfera, tais como estuários, lagoas, marismas e franjas de recifes de coral. Geralmente, zonas costeiras possuem uma dinâmica natural bastante intensa, caracterizando-se também como locais de elevada atividade antrópica.

A tendência humana em distribuir-se em regiões costeiras apresenta conseqüências danosas ao meio ambiente (KENNISH, 1996). O lançamento de compostos gerados pelo homem nestes ambientes atinge concentrações que alteram física, química e biologicamente os ecossistemas. Dentre os principais tipos de poluentes que afetam os ambientes aquáticos costeiros estão os metais (Hg, Cd, Pb e Cu), compostos organoclorados (ex. pesticidas, bifenilas policloradas), hidrocarbonetos de petróleo e outros produtos provenientes de esgotos industriais e urbanos (BAIRD, 2002). Estes poluentes terminam por atingir o ambiente estuarino na forma de misturas complexas, capazes de provocar efeitos deletérios nos organismos que o habitam (SHALAJA e D'SILVA, 2003).

Dentre as atividades antrópicas, destaca-se o consumo mundial de petróleo e seus derivados, que apresentou um grande crescimento nas últimas décadas, acompanhado pelo aumento da extração marinha de petróleo, da transferência e estocagem em zonas costeiras e do transporte marítimo destes produtos. Conseqüentemente, os níveis de contaminação dos ambientes marinhos costeiros por hidrocarbonetos também se elevaram. Aproximadamente 75% dos derrames de óleo acidentais nos Estados Unidos aconteceram em áreas costeiras, como estuários, baías fechadas e lagunas (KENNISH, 1992). Recentemente, em uma acidente causado por uma plataforma de exploração petrolífera, aproximadamente 5 bilhões de barris de petróleo foram lançados no Golfo do México, configurando-o como o pior acidente da história dos Estados Unidos.

O óleo pode impactar severamente populações da fauna e flora através de ações físicas, como sufocamento e redução da luz, modificações do habitat, tais como alteração no pH, diminuição do oxigênio dissolvido e diminuição na disponibilidade de alimento (KENNISH, 1992). As principais fontes de

hidrocarbonetos para o meio marinho e a quantidade anual de óleo despejado (toneladas) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais fontes de hidrocarbonetos para o ambiente marinho (CLARK, 2001).

| Fonte                                 | Total (milhões de toneladas.ano <sup>-1</sup> ) | Total      |
|---------------------------------------|---|------------|
| <i>Transporte</i>                     |   |            |
| Operações                             | 0,163   |            |
| Acidentes                             | 0,162   |            |
| Água de lastro e óleo combustível     | 0,524   |            |
| Doca seca                             | 0,009   |            |
| Sucata de navios                      | 0,002   |            |
| Acidentes com navios não petroleiros  | 0,020   |            |
| Emissões atmosféricas                 | 3,750   |            |
|                                       |   | 4,63       |
| <i>Instalações fixas</i>              |   |            |
| Refinarias costeiras                  | 0,10  |            |
| Produção "offshore"                   | 0,05  |            |
| Terminais marinhos                    | 0,03  |            |
|                                       |   | 0,18       |
| <i>Outras fontes</i>                  |   |            |
| Esgotos municipais                    | 0,70  |            |
| Esgotos industriais                   | 0,20  |            |
| Drenagem urbana                       | 0,12  |            |
| Drenagem de rios                      | 0,04  |            |
| Precipitação atmosférica              | 0,30  |            |
| Lixo oceânico                         | 0,02  |            |
|                                       |   | 1,38       |
| <i>Introdução natural</i>             |   | 0,25       |
|                                       | Total   | 6,44       |
| <i>Biossíntese de hidrocarbonetos</i> |   |            |
| Produção pelo fitoplâncton marinho    |   | 26000      |
| Precipitação atmosférica              |   | 100 – 4000 |

### 1.1 Hidrocarbonetos: origem, interação e efeitos no ambiente marinho

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos que contêm apenas carbono e hidrogênio nas suas moléculas. Podem ser divididos em 2 grupos principais: os hidrocarbonetos alifáticos e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os hidrocarbonetos alifáticos são os compostos de cadeia aberta e os policíclicos aromáticos são os compostos que possuem pelo menos um anel aromático na sua

molécula. Ambos são amplamente encontrados no ambiente marinho oriundos de fontes naturais e antrópicas. Os hidrocarbonetos alifáticos têm origem no petróleo, zooplâncton, fitoplâncton, microalgas e bactérias ou plantas terrestres, enquanto as fontes dos policíclicos aromáticos no meio marinho são as mais diversas e podem ser classificadas em quatro grupos: (1) petrogênica, introduzidos por derrames acidentais de petróleo ou derivados, operações de carga e descarga e de limpeza dos tanques dos petroleiros, extração, transporte e refino de óleo, infiltrações naturais através de fendas nos fundos oceânicos e escape de reservatórios naturais; (2) pirolítica, originados pela combustão incompleta da matéria orgânica, podendo ter origem natural, por meio de incêndios de florestas e erupções vulcânicas, ou antrópica, através da combustão incompleta do óleo ou combustíveis fósseis, incineração de resíduos e emissões dos veículos (McVEETY e HITES, 1988); (3) diagenética, através de transformações naturais da matéria orgânica mediante processos de descarboxilação e aromatização, e (4) biogênica: quando sintetizados por organismos como bactérias, plantas e fungos (LAW e BISCAYA, 1994).

O comportamento do óleo nos ambientes aquáticos depende principalmente da sua composição e de suas propriedades físicas e químicas. Devido a sua hidrofobicidade, os hidrocarbonetos possuem uma tendência de agregamento nas partículas em suspensão e rápida deposição nos sedimentos. A solubilidade dos compostos diminui com o aumento da massa molecular, enquanto que sua resistência às reações de oxidação, redução e volatilização aumentam com o número de anéis na molécula (READMAN, *et. al.*, 1984) (Tabela 2).

A severidade dos impactos causados pelos derrames de óleo nos animais marinhos depende de fatores como: quantidade, composição e forma do óleo, duração da exposição, estágio de desenvolvimento em que o animal se encontra, variações naturais do ambiente, incluindo salinidade, temperatura, turbidez da água e as operações de limpeza do óleo (CARLBERG, 1980; CORMACK, 1983; BOESCH, 1987; CLARK, 1992).

Pequenas alterações térmicas de matéria orgânica, como na formação de combustíveis fósseis, resultam principalmente em HPAs com estrutura de dois ou três anéis e uma grande proporção de homólogos alquilados, ou seja, compostos aromáticos que possuem um grupo metil associado e que devido ao seu processo de formação indicam fontes petrogênicas. Por sua vez, a combustão a altas temperaturas produz preferencialmente HPAs com uma estrutura de quatro, cinco ou

seis anéis e poucos produtos alquilados. Os HPAs de baixo peso molecular (dois e três anéis benzênicos fundidos) têm uma toxicidade aguda significativa, enquanto que alguns dos HPAs de maior peso molecular são carcinogênicos (TAM, 2001). Cabe ressaltar que quantidades de HPAs oriundos de fontes naturais são geralmente muito baixas comparadas a HPAs originados de fontes antropogênicas (WITT, 1995).

Tabela 2: Número de anéis, massa molecular, coeficiente de partição octanol-água (LogK<sub>ow</sub>) e carcinogenicidade dos 16 HPAs considerados prioritários para estudo pela USEPA (2005). NC – não carcinogênico, C – carcinogênico, fC – fracamente carcinogênico e FC – fortemente carcinogênico (Neff, 1979).

| HPAs                   | Nº Anéis | M.M. | Log K <sub>ow</sub> | Carcinogenicidade |
|------------------------|----------|------|---------------------|-------------------|
| Naftaleno              | 2        | 128  | 3,37                | NC                |
| Acenaftileno           | 3        | 152  | 4,07                | NC                |
| Acenafteno             | 3        | 154  | 4,33                | NC                |
| Fluoreno               | 3        | 166  | 4,18                | NC                |
| Fenantreno             | 3        | 178  | 4,46                | NC                |
| Antraceno              | 3        | 178  | 4,45                | NC                |
| Fluoranteno            | 4        | 202  | 5,33                | NC                |
| Pireno                 | 4        | 202  | 5,32                | NC                |
| Benzo(a)antraceno      | 4        | 228  | 5,61                | C                 |
| Criseno                | 4        | 228  | 5,61                | fC                |
| Benzo(b)fluoranteno    | 5        | 252  | 6,57                | C                 |
| Benzo(k)fluoranteno    | 5        | 252  | 6,84                | C                 |
| Benzo(a)pireno         | 5        | 252  | 6,04                | FC                |
| Dibenzo(a,h)antraceno  | 5        | 278  | 7,66                | C                 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 6        | 276  | 5,97                | C                 |
| Benzo(g,h,i)perileno   | 6        | 276  | 7,23                | NC                |

Animais marinhos apresentam uma variada capacidade de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo. Uma vez absorvidos, os hidrocarbonetos podem seguir três vias principais dentro do organismo: (1) podem ser metabolizados, (2) armazenados com a possibilidade de posterior excreção e (3) excretados sem modificações nas suas estruturas. Muitos invertebrados, peixes, mamíferos e aves metabolizam e excretam pelo menos alguns dos hidrocarbonetos incorporados durante a alimentação, respiração e natação (KENNISH, 1992)



A metabolização dos hidrocarbonetos envolve a ação das enzimas de biotransformação que, usualmente, estão presentes em níveis mais elevados no fígado e intestino de vertebrados ou em tecidos associados com o processamento de alimentos em invertebrados. A função principal dessas enzimas é transformar xenobióticos orgânicos lipossolúveis em metabólitos mais solúveis em água, facilitando a excreção dos mesmos. As enzimas de biotransformação podem ser de fase I (oxidação, redução, hidratação, hidrólise) quando introduzem (ou modificam) um grupo funcional (-OH, -COOH, -NO<sub>2</sub>, etc) no xenobiótico, enquanto as enzimas de fase II conjugam o xenobiótico à glutathione, sulfato, etc, que na maioria das vezes transforma-o em uma estrutura polar, prevenindo a interação do xenobiótico com outras moléculas do organismo. A biotransformação influencia a biodisponibilidade, o tempo de residência e a toxicidade do xenobiótico em um organismo (LIVINGSTONE, 1998).

Os HPAs e compostos resultantes da sua transformação metabólica quando não conjugados podem estabelecer ligações covalentes com macromoléculas celulares tais como proteínas e DNA, causando potenciais danos celulares, com consequentes efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. Há ainda indicações de que estes compostos podem se ligar seletivamente à superfície da membrana plasmática, causando perturbações na organização superficial da célula e aumentando a permeabilidade da membrana (NEFF, 1985). Sendo assim, a detecção e quantificação destes metabólitos podem prover melhor informação para avaliação de risco ambiental (LIVINGSTONE, 1991; STROOMBERG *et al.*, 1996).

De acordo com a perspectiva apresentada acima, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos que permitissem a identificação e o manejo dos riscos que a descarga indiscriminada de poluentes impõe ao meio ambiente. Além dos estudos de avaliação da quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais, é preciso detectar o impacto que esses poluentes causam nos organismos expostos. Assim, surgiu o estudo e desenvolvimento de biomarcadores que detectem efeitos deletérios que os contaminantes causam nos organismos.

## 1.2 Biomarcadores

No cargo da ecotoxicologia, biomarcadores podem ser definidos como qualquer resposta biológica, variando de molecular a comportamental, frente à presença de um contaminante no meio ambiente (LIVINGSTONE, 1993; WALKER, 2006). O uso de biomarcadores tem sido indicado pelos programas de monitoramento ambiental por serem considerados uma ferramenta sensível na avaliação da qualidade ambiental e dos efeitos biológicos dos poluentes. Alguns biomarcadores moleculares, celulares ou organísmicos podem, ainda, ser adequados para avaliação da exposição ou o efeito de determinados contaminantes (LIVINGSTONE, 1993; WALKER, 1996).

Diversas classificações para os biomarcadores têm sido propostas. A mais utilizada atualmente é a que divide os biomarcadores em biomarcadores de exposição e de efeito. Biomarcadores de exposição são aqueles que indicam que o organismo foi exposto ao contaminante, mas não fornece informação sobre o grau de efeito adverso causado pelo contaminante. Biomarcadores de efeito são aqueles que indicam um dano ao organismo (WALKER, 1996). No entanto, WHO (1993) propôs mais uma classe para divisão dos biomarcadores, os de suscetibilidade, que tratam da capacidade adquirida por um organismo em responder à exposição a um xenobiótico específico, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores.

Para que se tenha uma medida mais aproximada da real exposição dos organismos aos poluentes é necessário estabelecer conexões entre os níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação dos tecidos e efeitos adversos primários (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Como a maioria dos xenobióticos começa exercendo seus efeitos tóxicos através de interações com biomoléculas (NEWMAN, 1998), é de suma importância que se conheça o destino e o efeito dos poluentes nos níveis mais baixos de organização biológica para que se possam adotar estratégias de biomonitoramento, avaliação de impactos e manejo ambiental (LIVINGSTONE, 1998).

### 1.2.1 A Família CYP1A e a 7-Etoxiresorufina O-desetilase (EROD)

Como mencionado anteriormente, a biotransformação é um processo metabólico que envolve diferentes sistemas enzimáticos e tem como principal função converter as estruturas tóxicas de xenobióticos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, para que sejam facilmente excretadas pelos organismos. A oxidação é um dos processos enzimáticos iniciais (fase I) da biotransformação de compostos orgânicos lipofílicos. Nesta etapa, participam as monooxigenases, as oxidases de função mista (MFO), que são enzimas que catalisam reações de oxidação ou hidroxilação, incorporando um átomo de oxigênio diretamente ao substrato orgânico. As duas principais enzimas envolvidas neste processo são a flavoproteína NADPH-citocromo redutase e o citocromo P450 (LEHNINGHER, 2005).

O citocromo P450 é uma heme proteína que utiliza o  $Fe^{2+}$  como grupo prostético. Ele está presente, em sua maioria, no retículo endoplasmático liso e nas mitocôndrias de vertebrados e invertebrados aquáticos. Embora existam diferenças no mecanismo de indução entre vertebrados e invertebrados, este sistema está entre um dos mais citados na literatura como biomarcador de contaminação por compostos orgânicos planares (LIVINGSTONE, 1998).

Através do sequenciamento de alguns genes do citocromo P450 adotou-se a nomenclatura CYP seguida pelo número da família, da letra da subfamília e do número do gene específico. As diferentes subfamílias são classificadas considerando: o peso molecular monomérico, a composição de aminoácidos, a sequência terminal de aminoácidos, a especificidade ao substrato e o tipo de reação em que estão envolvidas. A família CYP1 em particular, interage com compostos de estrutura plana como os HPAs, as bifenilas policloradas e as dioxinas (VAN DER OOST, 2003).

O mecanismo de indução das enzimas do sistema CYP1A em mamíferos e vertebrados em geral é bem conhecido. Esta indução é mediada através da ligação de xenobióticos ao receptor citosólico aril hidrocarboneto (AhR), uma proteína solúvel que está envolvida na expressão de genes após a interação com certos compostos, como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, compostos aromáticos halogenados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Resumidamente, a via de ativação do AHR pode ser descrita assim: 1) a ativação do AHR por um agonista (HPAs); 2) interação com o translocador nuclear do receptor AHR (ARNT); 3)

translocação do AHR para o núcleo; 4) ligação nos elementos de resposta a xenobióticos (XRE); 5) iniciação da transcrição de inúmeros genes das fases de biotransformação (TIMME-LARAGY et al., 2007).

A subfamília CYP1A1 é expressa cataliticamente pela atividade da EROD. A indução da EROD é um indicador extremamente sensível das alterações ambientais e geralmente é um dos primeiros sinais detectáveis que quantificam respostas à exposição a certos compostos (STEGEMAN & HAHN, 1992). Estudos à respeito dos mecanismos de indução da CYP1A sugerem que a EROD pode não só indicar exposição química, mas também prever efeitos em vários níveis de organização biológica (WHYTE et al., 2000), configurando a EROD como um excelente biomarcador de contaminação ambiental para contaminantes orgânicos.

Tabela 3: Trabalhos que confirmam a indução da EROD em estudos de campo. PCBs= Bifenilas Policloradas, HPAs= Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, OFFs= Organofosforados, B(a)P= Benzo(a)Pireno, (+) indução, (++)= forte indução, (-)= inibição. Adaptado de: Snyder, 2000 e Van der Oost, 2003.

| Espécie                              | Poluente          | EROD | Referência                   |
|--------------------------------------|-------------------|------|------------------------------|
| <i>Gadus morhua</i>                  | PCBs e HPAs       | +    | Goksoyr et al., 1994         |
| <i>Cyprinus carpio</i>               | HPAs              | ++   | Van der Oost et al., 1998    |
| <i>Limanda limanda</i>               | HPAs e PCBs       | +    | Bourgeot et al., 1996        |
| <i>Platichthys flesus</i>            | PCBs e HPAs       | -    | Eggens et al., 1995          |
| <i>Mugil sp.</i>                     | HPAs, PCBs e OFFs | ++   | Rodriguez-Ariza et al., 1994 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>           | PCBs              | -    | Otto et al., 1996            |
| <i>Pseudopleuronectes americanus</i> | HPAs              | +    | Payne, 1987                  |
| <i>Carcinus aestuarii</i>            | HPAs e PCBs       | +    | Ricciardi et al., 2010       |
| <i>Maja crispata</i>                 | B(a)P             | -    | Bihari et al., 1984          |
| <i>Gammarus pulex</i>                | Pb                | -    | Kutlu, et al., 2004          |

### 1.3 Caracterização das espécies monitoras

Em estudos de biomonitoramento ambiental, a escolha das espécies utilizadas é de extrema importância, pois é através delas que o ambiente será caracterizado e avaliado. Por esse motivo, recomenda-se empregar no mínimo 3 espécies que pertençam a diferentes níveis na teia trófica, a fim de se obter

resultados mais abrangentes. As espécies escolhidas para este estudo possuem significativa representação ecológica dentro do ecossistema costeiro do Rio Grande do Sul, têm ampla distribuição e têm suas características biológicas, fisiológicas e hábitos alimentares bem conhecidos.

### 1.3.1 O copépode *Acartia tonsa*

*Acartia tonsa* é uma espécie dominante nas áreas costeiras e estuarinas do Oceano Atlântico, sendo encontrada no estuário da Lagoa dos Patos (RS) em salinidades de 0 a 31,5 (eurialina) e temperaturas de 14 a 29°C (euritérico) (MONTÚ e GOEDEN, 1986). Este copépode está presente no estuário da Lagoa dos Patos durante todo o ano, sendo descrito nesse ambiente como um dos organismos dominantes e chave da cadeia trófica (MONTÚ, 1980).

O desenvolvimento das populações do gênero *Acartia* caracteriza-se por um rápido tempo de recrutamento, produção de ovos quiescentes em períodos de extrema fadiga ambiental, intervalos de muda tendendo a ser constantes, e aumento exponencial em tamanho até a fase adulta (MILLER, 1992). Quanto à produção de ovos, diferentes valores são encontrados na literatura, sendo esta muito influenciada pela qualidade do alimento. Os dados obtidos em laboratório e no ambiente também são discrepantes.

Como a maioria das espécies zooplanctônicas, os copépodes alimentam-se de fitoplâncton. Assim, constituem-se como importantes elos na transferência de energia para os níveis tróficos superiores na teia alimentar marinha.

### 1.3.2 O siri-azul *Callinectes sapidus*

O siri-azul *Callinectes sapidus* é hiper-osmorregulador em baixas salinidades, sendo que a partir da salinidade 27, na qual o organismo apresenta seu ponto isosmótico, esta espécie passa a ser osmoconformadora (MANTEL e FARMER, 1983; PILLER *et al.*, 1995).

Esta espécie ocorre na costa leste do Oceano Atlântico, em estuários, lagunas, deltas de rios e regiões oceânicas adjacentes, desde a costa dos Estados Unidos até o Uruguai (WILLIAMS, 1974). O siri-azul possui padrão de distribuição

disjunto, ou seja, apresenta uma área de distribuição norte e outra sul, sendo separada por um hiato de pelo menos 50° de latitude, que ocorre no Golfo do México (MELO, 1996). Foi citado por Capitoli *et al.* (1978) e Topin e Souza (1982) como uma espécie frequente na Lagoa dos Patos (RS).

Devido a seus hábitos alimentares, *C. sapidus* constitui-se num predador bentônico chave por controlar a abundância de outras espécies bentônicas estuarinas, consumindo uma grande variedade de organismos tanto da infauna como epifauna, como por exemplo bivalves, poliquetas, crustáceos (OLIVEIR, 2006).

O ciclo reprodutivo de *C. sapidus* está relacionado à ampla faixa de variação de salinidade dos estuários que estes animais habitam (WILLIAMS, 1974; CAPITOLI *et al.*, 1978). Após o acasalamento dentro do estuário, as fêmeas dirigem-se durante a maré baixa para a boca do estuário e costa adjacente do oceano, onde desovam até 4 milhões de larvas por indivíduo. Após a desova, eles voltam para o interior do estuário.

### 1.3.3 A corvina *Micropogonias furnieri*

A corvina *Micropogonias furnieri* é uma espécie costeira de ampla distribuição e grande importância econômica nas pescarias costeiras do Brasil, Uruguai e Argentina. No Estuário da Lagoa dos Patos, *M. furnieri* é a espécie mais abundante na pesca artesanal (REIS, 2000).

Esta espécie utiliza, ao longo do ano, a totalidade do ambiente estuarino, mostrando sua ampla adaptabilidade às diferenças de salinidade que ocorrem neste ambiente, e sua distribuição quanto a profundidade varia segundo o hábito trófico dos indivíduos, o qual está relacionado com a ontogenia da espécie e o tamanho dos indivíduos em suas classes de tamanho (CASTELO, 1986).

No Brasil, a desova de *M. furnieri* ocorre na primavera e no verão em águas costeiras, mas sob o aporte de água doce da Lagoa dos Patos (VAZZOLER, 1991), e seus ovos são distribuídos em todo o estuário. As larvas são planctófagas e os juvenis e adultos são consumidores bentônicos, em fundo de lama e areia, com preferências por pequenos invertebrados, principalmente poliquetas e crustáceos migratórios, e em menor proporção, por moluscos e pequenos peixes, conferindo a esta espécie grande importância na cadeia trófica do estuário da Lagoa dos Patos (VIEIRA *et al.*, 1998).

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) como biomarcador de contaminação aquática por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em diferentes espécies do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS).

### *Objetivos Específicos*

- Quantificar a atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em fígado e hepatopâncreas de *Micropogonias furnieri* e *Callinectes sapidus*, respectivamente, bem como em copépodes (*Acartia tonsa*) provenientes de diferentes locais do estuário da Lagoa dos Patos - RS.
- Determinar a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no fígado e hepatopâncreas de corvinas (*M. furnieri*) e siris (*C. sapidus*), bem como em copépodes (*A. tonsa*) provenientes de diferentes locais do estuário da Lagoa dos Patos - RS.
- Relacionar resultados de atividade enzimática (EROD) com a concentração de HPAs nas três espécies estudadas e identificar em qual espécie a EROD pode se configurar como um biomarcador de contaminação aquática por hidrocarbonetos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é parte do projeto "Identificação e desenvolvimento de bioindicadores para determinação da qualidade das águas estuarinas da Lagoa dos Patos (RS) utilizadas em aquicultura e pesca" (CNPq/nº 552646/2007-1), que juntamente com outros trabalhos em andamento pretende determinar e testar biomarcadores de contaminação aquática em diferentes níveis biológicos e avaliar uma série de contaminantes na água e na biota residente, visando assim, a modelagem ecotoxicológica para uso na avaliação do impacto antrópico e monitoramento destas águas.

#### 3.1 Área de Coleta

A Lagoa dos Patos é a maior lagoa costeira do Brasil e a segunda maior da América Latina. Situada no Rio Grande do Sul, este corpo d'água tem 265 quilômetros de comprimento e uma área superficial de 10.144 km<sup>2</sup>, estendendo-se na direção norte-nordeste-sul-sudoeste, paralelamente ao Oceano Atlântico.

A região estuarina da Lagoa dos Patos (Fig. 1) ocupa aproximadamente 10% da superfície total da Lagoa, sendo caracterizada por amplas regiões de bancos (80%), canais naturais e artificiais e sacos marginais rasos. A conexão entre o estuário e o Oceano Atlântico se dá através de uma estreita entrada (750 m de largura), cujo canal de acesso possui profundidade média de 14 m e máxima de 20 m. O limite interior para a penetração da água salgada é a 60 km da boca do estuário (Ponta da Feitoria). A média anual de salinidade no estuário é 13, com valores instantâneos variando de 0 a 34 (CASTELLO, 1985). Gradientes verticais são observados e o estuário pode variar desde o tipo cunha salina até bem misturado (MOLLER & e CASTAING, 1999; FERNANDES *et al.*, 2003).

A hidrodinâmica do estuário é controlada pela combinação dos efeitos causados pela ação do vento local sobre a superfície da água (mecanismo de elevação/rebaixamento), pela ação do vento não-local agindo na região costeira (transporte de Ekman agindo a 90° para a esquerda da direção do vento), e pela descarga dos rios na região norte da laguna (MOLLER *et al.*, 1996).

No estuário da Lagoa dos Patos, os contaminantes podem ser introduzidos a partir das porções mais altas da própria Lagoa, uma vez que esta recebe água de



drenagem oriunda de diversos rios. Além disso, as atividades industriais na bacia de drenagem da Lagoa dos Patos podem aumentar o aporte de contaminantes e elevar esporadicamente suas concentrações neste ambiente (NIENCHESKI e BAUMGARTEN, 1998).

O município de Rio Grande (RS), que possui cerca de 190 mil habitantes, está localizado na parte central do estuário da Lagoa dos Patos (Fig 1), e nele está instalado o segundo maior complexo portuário da América Latina. Além disso, a cidade possui um complexo industrial bem desenvolvido, composto por indústrias que produzem fertilizantes, terminais e refinarias de petróleo e derivados, bem como as indústrias de processamento de pescado e cereais (BAUMGARTEN & NIENCHESKI, 1998). Efluentes oriundos destas indústrias, bem como esgotos domésticos, desembocam na Lagoa dos Patos muitas vezes sem o tratamento adequado, aumentando o potencial risco de poluição no estuário (MIRLEAN, 2003).

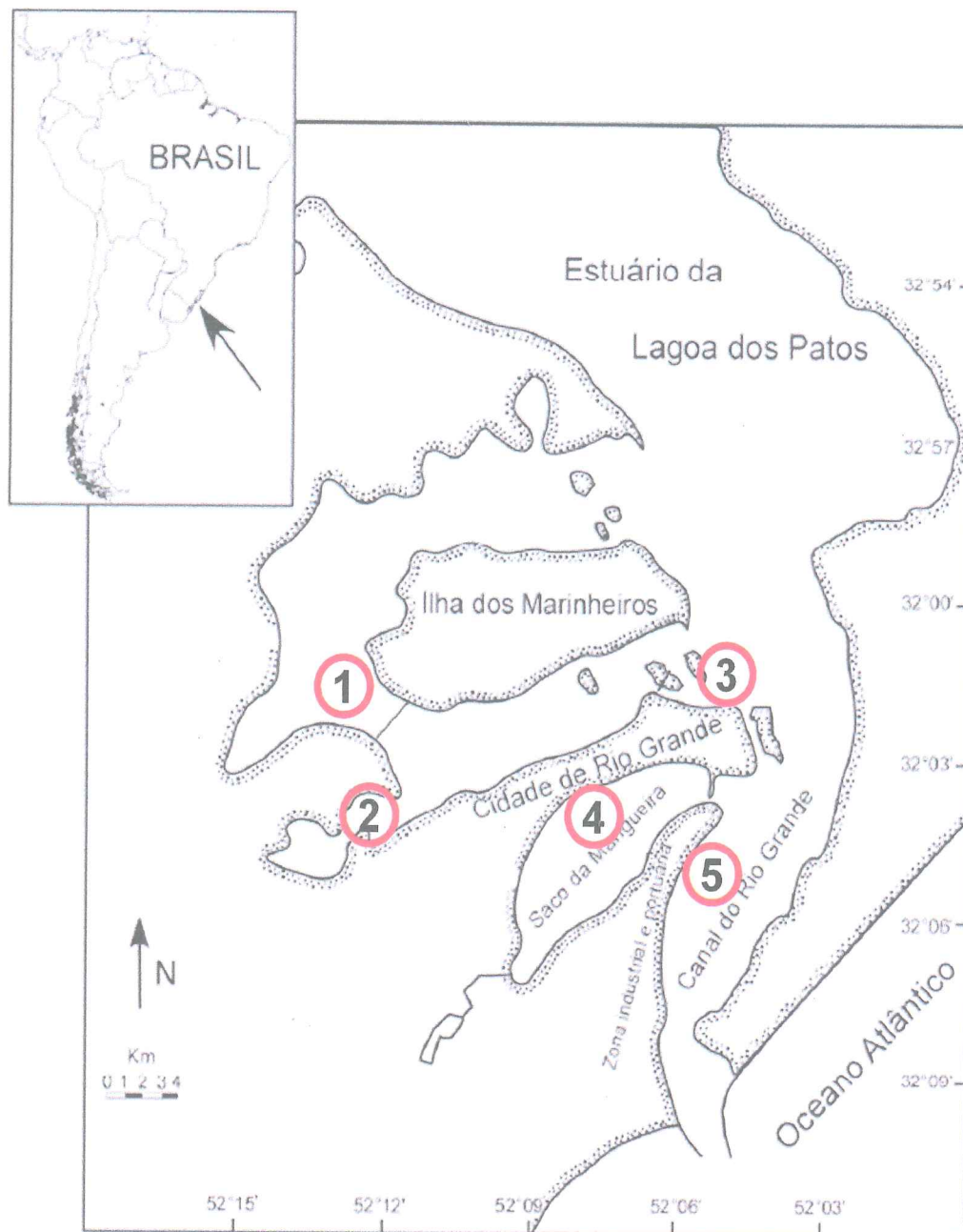


Figura 1: Região estuarina da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) e pontos de coleta das amostras(1- Ilha dos Marinheiros; 2- Saco do Justino; 3- Yacht Club; 4- Saco da Mangueira; 5- Canal de Acesso ao Porto de Rio Grande). Adaptado de: ANDRADE, 2005.

### 3.2 Coleta dos Animais

Foram escolhidos 5 pontos do estuário da Lagoa dos Patos (Fig. 1) durante as 4 estações (primavera, verão, outono e inverno) dos anos de 2008 e 2009, de

acordo com o estado de contaminação ambiental obtido a partir de resultados segundo o Projeto RECOS (2005).

Os pontos de menor influência antrópica são (1) Ilha dos Marinheiros e (2) Saco do Justino. Por outro lado, os pontos com maior influência antrópica e, supostamente mais contaminados são (3) *Yatch Club*, (4) Saco da Mangueira e (5) Canal de Acesso ao Porto de Rio Grande.

Exemplares juvenis de *M. furnieri*, medindo no máximo 15 cm de comprimento total e exemplares juvenis de *C. sapidus*, foram coletados no estuário da Lagoa dos Patos com o auxílio de uma rede de arrasto de fundo (malha 12 mm). Os animais coletados foram acondicionados em caixas térmicas com gelo, até a chegada ao Laboratório de Zoofisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG, onde já crioanestesiados tiveram seus fígados (peixe) ou hepatopâncreas (siri) dissecados para as análises enzimáticas da EROD e determinação da concentração de hidrocarbonetos. As amostras de tecido destinadas a análise de hidrocarbonetos foram agrupadas de 5 em 5, totalizando 2 amostras por ponto de coleta para cada estação do ano.

Os copépodes *A. tonsa* foram coletados com o auxílio de uma rede de zooplâncton (malha 50  $\mu$ m), e acondicionados em baldes com água do local aerada durante a transferência do local de coleta para o laboratório mencionado acima. Devido ao tamanho diminuto dos copépodes, estes foram agrupados em *pools* de aproximadamente 300 animais para facilitar as análises enzimáticas e de hidrocarbonetos. Não foram realizadas análises nos meses de primavera e verão, devido a ausência ou o reduzido número de copépodes coletados no estuário da Lagoa dos Patos

Os tecidos dissecados dos peixes e siris (fígado e hepatopâncreas) e os copépodes inteiros destinados às análises de hidrocarbonetos foram devidamente acondicionadas em papel alumínio calcinado (aquecidos a 450  $^{\circ}$ C por 8 h) e estocadas à -80  $^{\circ}$ C.

Em cada campanha de coleta eram medidas e registradas as características biométricas dos peixes (peso, comprimentos padrão e total) e dos siris (peso e comprimento da carapaça). Também, foram registrados alguns parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura e salinidade), utilizando pHmetro, termômetro de campo e refratômetro.

### 3.3 Análise da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)

A atividade da EROD foi determinada em homogeneizados de fígados e hepatopâncreas de *M. furnieri* e *C. sapidus* respectivamente, e pools de *A. tonsa* seguindo um protocolo adaptado de EGGENS E GALGANI (1992). Este método mede a taxa de indução das izoenzimas CYP1A (atividade catalítica) através de uma reação de desetilação com o substrato adicionado (7-etoxiresorufina) para formar o produto final (resorufina), que é lido por espectroscopia de fluorescência. A intensidade da fluorescência corresponde à resorufina produzida por unidade de tempo. O resultado foi então padronizado com base no conteúdo de proteína da amostra, previamente mensurado utilizando-se um kit colorimétrico para proteínas (Doles<sup>®</sup>, Goiânia, GO). A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de resorufina por minuto por mg de proteína ( $\mu\text{mol}$  resorufina. $\text{min}^{-1}$ .mg prot<sup>-1</sup>).

### 3.4 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em material biológico

As análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em fígado e hepatopâncreas de *M. furnieri* e *C. sapidus* respectivamente, bem como em copépodes inteiros, foram realizadas no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) do Instituto Oceanográfico da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

#### 3.4.1 Limpeza do Material

Os cuidados com a limpeza do material utilizado garantem a exclusão de interferentes que possam alterar a qualidade da análise, pois a análise de microcontaminantes orgânicos geralmente resulta em concentrações na ordem de  $\mu\text{g. g}^{-1}$  e  $\text{ng. g}^{-1}$ .

A limpeza do material consiste basicamente na lavagem e enxágue com solventes ou calcinação. Toda a vidraria utilizada no desenvolvimento deste trabalho foi lavada com detergente aniônico alcalino (5 %, v/v) Detertec<sup>®</sup> (Vetec) e, posteriormente, imersas nessa solução de 12 a 24 h. Após ser enxaguada com água corrente, a vidraria foi imersa em uma solução de ácido nítrico (5 %, v/v), também permanecendo nesta solução por 12 a 24 h. Após enxágüe, a vidraria foi seca em

estufa com circulação forçada a 35 °C. As vidrarias volumétricas que não podem ser calcinadas a 450 °C foram enxaguadas 3 vezes com acetona P.A. e 3 vezes com *n*-hexano, utilizando uma Pipeta de Pasteur, imediatamente antes do uso.

Os adsorventes sílica e alumina neutra (Merck) foram previamente calcinados a 450 °C durante 8 h. A ativação dos adsorventes foi feita a 160 °C por 4 h. A desativação a 5% foi realizada utilizando água tipo Mili-Q® purificada através de um sistema de extração líquido-líquido com *n*-hexano. Todo o sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) utilizado neste trabalho foi calcinado a 450 °C durante 8 h.

### 3.4.2 Procedimento Analítico

Para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas amostras de fígado e hepatopâncreas foi seguido o protocolo de Niencheski & Fillmann (2006), com pequenas modificações. A análise é dividida em 3 etapas principais: extração, purificação e fracionamento (*clean-up*) e determinação e quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa (Fig. 2).

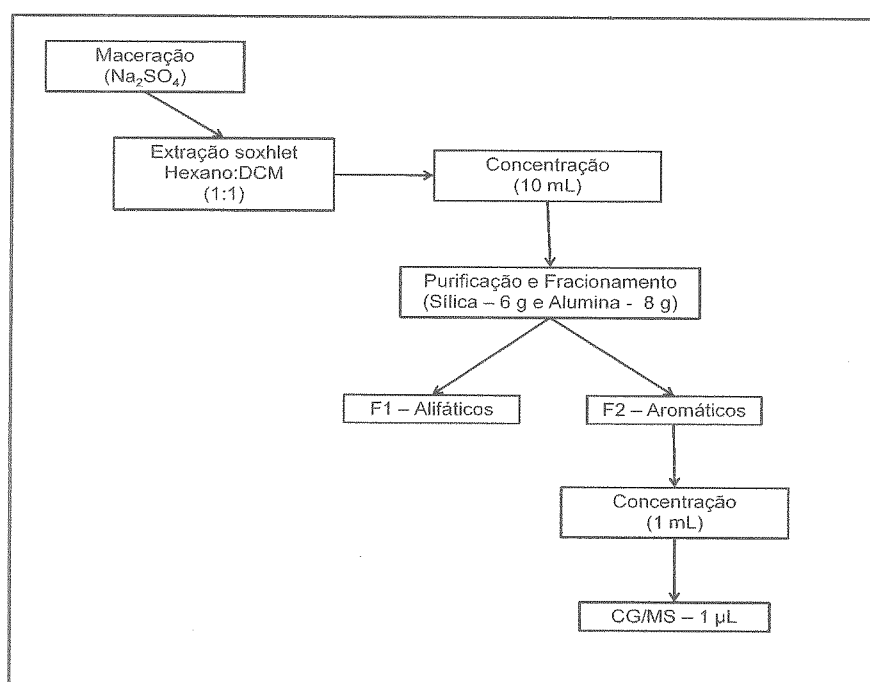


Figura 2: Fluxograma da análise de HPAs em tecidos animais.

A extração foi feita através de um aparato de extração Soxhlet, onde a amostra previamente macerada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) foi extraída durante 12 h com uma mistura de solventes *n*-hexano/diclorometano (1:1). Os

extratos foram concentrados a 10 mL com o auxílio de um evaporador rotatório e fluxo leve de nitrogênio ( $N_2$ ). A quantidade de lipídios presentes em cada amostra foi calculada gravimetricamente, utilizando-se 1 mL do extrato.

Para a purificação e fracionamento, o restante do extrato de amostra (9 mL) foi evaporado sob fluxo de nitrogênio até o volume de 1 mL e fracionado por cromatografia líquida de adsorção em coluna aberta empacotada com sílica (6 g) e alumina (8 g), as quais foram previamente desativadas a 5 %.

A 1ª fração (F1), contendo os hidrocarbonetos alifáticos, foi eluída com 25 mL de *n*-hexano. A 2ª fração (F2), contendo os HPAs, foi eluída com 30 mL de diclorometano/*n*-hexano (1:9), seguido de 35 mL de diclorometano/*n*-hexano (1:1). Como os hidrocarbonetos alifáticos não foram determinados neste trabalho, a F1 foi descartada. A fração F2 eluída foi concentrada em evaporador rotatório e fluxo suave de  $N_2$  até o volume de 1 mL, sendo mantida a 10 °C até sua análise.

A análise de HPAs em *pools* de copépodes foi realizada segundo o método de Cotta *et al.* (2009). Foram adicionados 10 mL de diclorometano na amostra, e esta foi sonicada em banho de ultrassom, durante 10 min com intervalos de 2 min a cada 3 min de banho. Após a extração, as amostras foram evaporadas em fluxo de  $N_2$  leve e foi realizada uma filtração em uma fina coluna de  $Na_2SO_4$ .

A identificação e quantificação dos HPAs na F2 foi realizada em um cromatógrafo de fase gasosa Perkin Elmer Clarus 500 equipado com detector de espectrometria de massa (CG-EM) e injetor automático de amostra. Foi utilizada uma coluna cromatográfica capilar (Elite-5MS – 5 % Diphenil – 95 % Dimetilsiloxane) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu$ m de espessura de filme. A programação de temperatura iniciou em 40 °C, com aumento à taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 60 °C. Depois houve um aumento da temperatura na razão 5 °C min<sup>-1</sup> até 290 °C, sendo mantida por 5 min. Após isso, houve um aumento da temperatura na razão de 10 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, sendo mantida por 10 min. A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C no modo *splitless* (fluxo do split 50:1 após 1 min). A linha de transferência foi mantida a 280 °C e a fonte do detector a 200 °C com energia de 70 eV. Foi utilizado He como gás carreador em um fluxo de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. Um volume de 1  $\mu$ L de amostra foi injetado no modo *SIFI* que permite o escaneamento simultâneo nos modos íons seletivo (SIM) e completo (*Full Scan*).

Para avaliar a qualidade do procedimento analítico, a cada 11 amostras analisadas, uma correspondia a um branco de extração. O branco de extração era composto por 5 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e indicava a presença ou ausência de interferentes relacionados aos solventes orgânicos (*n*-hexano e diclorometano). Não foi observado contaminação nos controles analisados.

A recuperação da metodologia foi avaliada através da adição do *p*-terfenil-d14 como padrão de recuperação. Neste trabalho, somente foram utilizadas as amostras que apresentaram de 60 a 120% de recuperação de *p*-terfenil-d14.

A identificação dos compostos foi baseada nos espectros de massas individuais, nos tempos de retenção comparados com os obtidos para os 21 hidrocarbonetos aromáticos parentais determinados, utilizando-se os seguintes padrões externos: naftaleno, 1,7- dimetil naftaleno, 2,6- dimetil naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(123-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno, bifenil, dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno). Como padrões internos foram utilizados: (naftaleno-d8, acenaftaleno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12, perileno-d12) e ainda, quando necessário os resultados foram comparados com os dados contidos na biblioteca de espectros de massas do NIST (National Institute of Standards and Technology) contida no software Turbo Mass<sup>®</sup> (Fig 3).

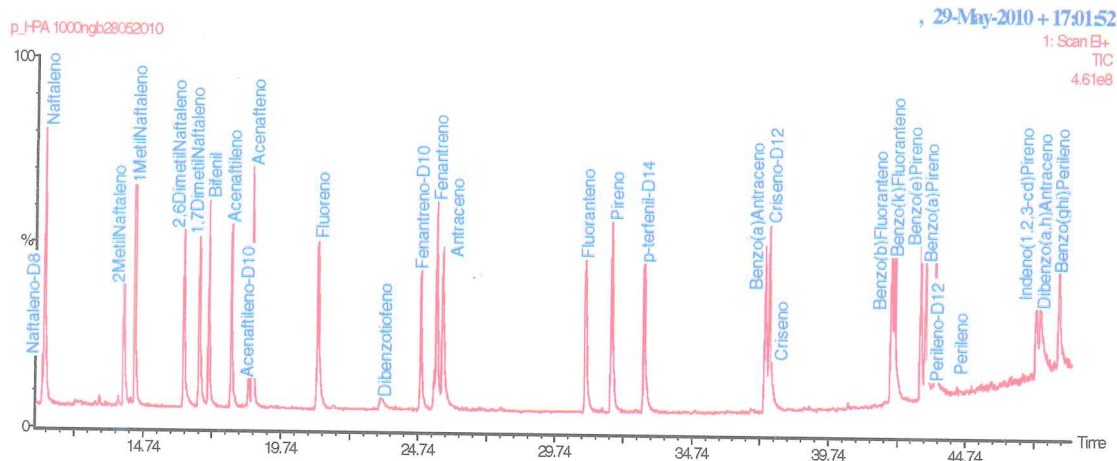


Figura 3: Cromatografia no modo Full Scan com os tempos de retenção e íons característicos representativos dos padrões externos de HPAs ( $500 \text{ ng.mL}^{-1}$ )

### 3.5 Análises Estatísticas

Para verificar diferenças tanto na atividade da EROD quanto na concentração de HPAs entre as estações do ano, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de Kruskal-Wallis, seguida do teste *a posteriori* de Dunn.

Para relacionar a atividade da EROD com a concentração de HPAs, as variáveis abióticas e com os dados biológicos (biométricos), foi utilizada a análise de regressão múltipla. O critério de informação de Akaike juntamente com a análise do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), foi utilizado para selecionar o modelo linear que melhor explicava a variável dependente, no caso, a atividade da EROD. Foi utilizada também uma análise de regressão seccionada (piecewise), que determina duas equações da reta para uma mesma série de dados, bem como um ponto de quebra, ou seja, um ponto aonde a série muda seu comportamento e passa a ser explicada por outra equação. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 95 % ( $\alpha = 0,05$ )



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados Biológicos e Parâmetros Abióticos

Com o intuito de se avaliar uma possível relação entre as variáveis ambientais e a atividade da EROD, durante todas as coletas foram medidos a temperatura, o pH e a salinidade da água superficial dos locais amostrados (Tabela 4). Em algumas situações foram necessárias mais de uma coleta para obtenção do número mínimo de indivíduos, portanto a Tabela 4 apresenta resultados para cada espécie amostrada.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos da água de superfície nos locais de amostragem no momento das coletas dos animais. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

| Média dos Parâmetros Físico-Químicos da Água |           |                  |                 |               |
|--|-----------|------------------|-----------------|---------------|
|  | Estação   | Temperatura (°C) | pH              | Salinidade    |
| <i>Acartia tonsa</i>                         | Inverno   | 13,2 $\pm$ 0,47  | 7,65 $\pm$ 0,35 | 10 $\pm$ 2,50 |
|  | Outono    | 23,0 $\pm$ 3,61  | 8,04 $\pm$ 0,53 | 20 $\pm$ 6,81 |
| <i>Micropogonias furnieri</i>                | Inverno   | 16,8 $\pm$ 3,93  | 7,50 $\pm$ 0,15 | 5 $\pm$ 3,06  |
|  | Outono    | 23,0 $\pm$ 1,01  | 8,04 $\pm$ 0,51 | 15 $\pm$ 7,31 |
|  | Primavera | 16,4 $\pm$ 1,31  | 7,60 $\pm$ 0,34 | 2 $\pm$ 0,0   |
|  | Verão     | 24,1 $\pm$ 1,32  | 8,19 $\pm$ 0,43 | 22 $\pm$ 7,55 |
| <i>Callinectes sapidus</i>                   | Inverno   | 14,0 $\pm$ 0,74  | 7,80 $\pm$ 0,35 | 7 $\pm$ 2,73  |
|  | Outono    | 23,0 $\pm$ 1,01  | 8,01 $\pm$ 0,49 | 8 $\pm$ 8,94  |
|  | Primavera | 16,5 $\pm$ 1,15  | 7,33 $\pm$ 0,34 | 2 $\pm$ 0,44  |
|  | Verão     | 22,0 $\pm$ 1,53  | 8,19 $\pm$ 0,48 | 26 $\pm$ 2,78 |

Previamente à dissecação das corvinas e dos siris, foi realizada a biometria dos indivíduos coletadas, pois é sabido que a maioria dos processos fisiológicos e

bioquímicos são afetados pelo grau de desenvolvimento do animal. Os dados de biometria obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Biometria dos animais coletados em diferentes estações do ano. (CP = comprimento padrão, CT = comprimento total, CC = comprimento da carapaça). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

| Dados Biológicos              |          |                   |                  |                            |          |                  |
|-------------------------------|----------|-------------------|------------------|----------------------------|----------|------------------|
| <i>Micropogonias furnieri</i> |          |                   |                  | <i>Callinectes sapidus</i> |          |                  |
|                               | Peso (g) | CP (cm)           | CT (cm)          |                            | CC (cm)  |                  |
| Inverno                       | $n = 48$ | $27,17 \pm 14,2$  | $10,75 \pm 2,41$ | $13,35 \pm 2,31$           | $n = 40$ | $10,15 \pm 1,71$ |
| Outono                        | $n = 48$ | $44,7 \pm 28,43$  | $12,67 \pm 2,61$ | $15,52 \pm 3,08$           | $n = 39$ | $9,40 \pm 2,22$  |
| Primavera                     | $n = 41$ | $26,91 \pm 13,60$ | $10,96 \pm 1,68$ | $13,26 \pm 2,02$           | $n = 50$ | $9,90 \pm 2,02$  |
| Verão                         | $n = 46$ | $51,62 \pm 33,92$ | $13,15 \pm 3,29$ | $15,85 \pm 4,19$           | $n = 46$ | $10,19 \pm 1,29$ |

#### 4.2 Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase

A quantificação da atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em hepatopâncreas de *C. sapidus* mostrou diferenças significativas quanto às estações do ano. O maior valor médio foi observado no outono ( $325,35 \mu\text{mol resorufina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ), sendo que este não foi significativamente diferente daquele medido no verão. Por sua vez, o menor valor médio foi detectado na primavera ( $0,75 \mu\text{mol resorufina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ), sendo que este não foi significativamente diferente daquele medido no inverno. Os resultados do outono e verão diferiram daqueles encontrados para a primavera e inverno (Fig. 4).

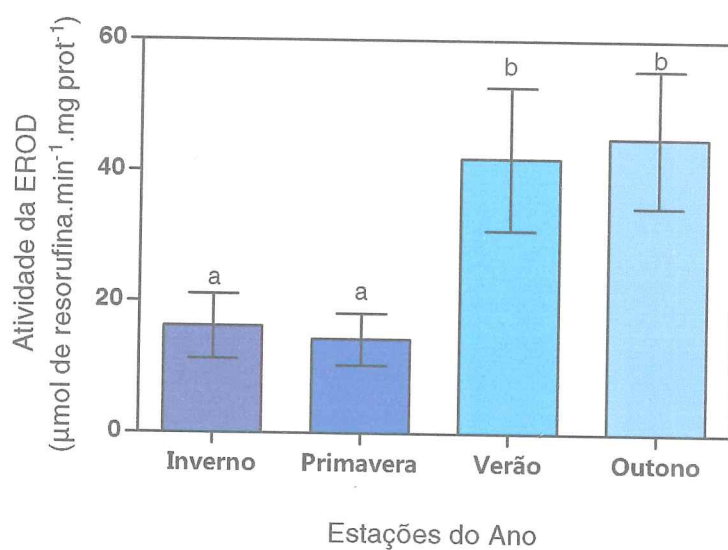


Figura 4: Atividade da EROD no hepatopâncreas de *Callinectes sapidus* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A análise da EROD em fígado de *M. furnieri* apresentou o maior valor no inverno ( $244,98 \mu\text{mol resorufina}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ), por sua vez, o menor valor foi observado no outono ( $8,17 \mu\text{mol resorufina}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ), sendo que este não foi significativamente diferente daquele medido no verão. Os resultados do inverno e primavera foram significativamente menores do que os observados no verão e outono (Fig. 5).

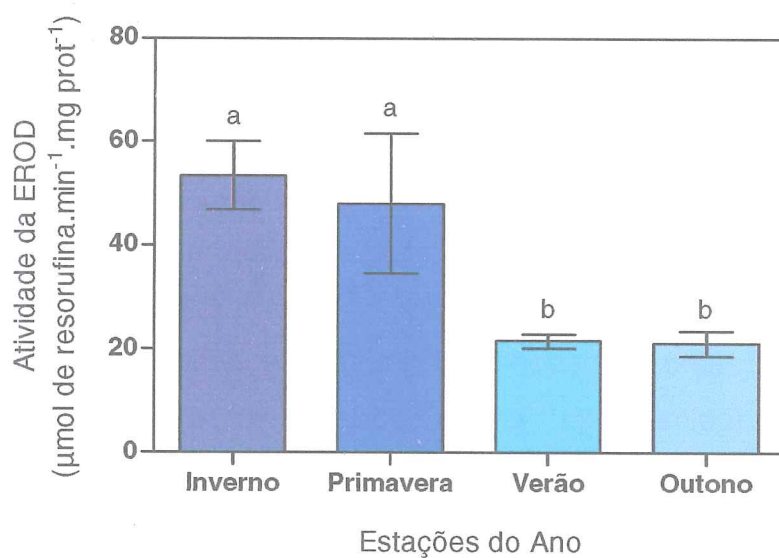


Figura 5: Atividade da EROD no fígado de *Micropogonias furnieri* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Quanto às análises da atividade da EROD em *pools* do copépode *A. tonsa*, o maior valor foi obtido no outono ( $25,99 \mu\text{mol resorufina.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ) e o menor valor foi observado no inverno ( $2,53 \mu\text{mol resorufina.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ) (Fig. 6).

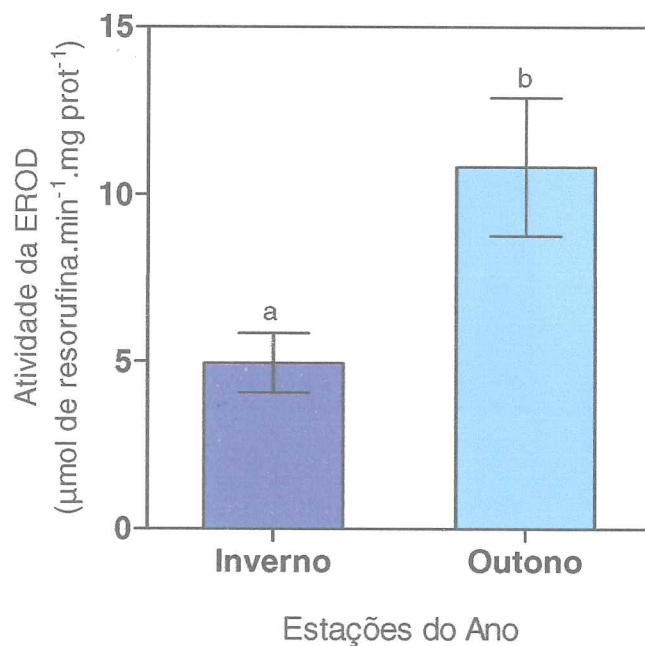


Figura 6: Atividade da EROD em *Acartia tonsa* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em material biológico

As maiores concentrações de HPAs no fígado de *M. furnieri* foram detectadas no inverno (173,77 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido) e verão (121,13 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido). O valor médio observado no inverno diferiu significativamente daquele medido na primavera (65,75 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido) e no outono (14,09 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido) (Fig. 7). Por outro lado, o somatório dos HPAs encontrados em hepatopâncreas de *C. sapidus* não variou entre os meses de inverno (361,61 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido), primavera (333,87 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido) e verão (383,05 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido). Somente no outono a concentração de HPAs (100,83 ng.g<sup>-1</sup> peso úmido) foi significativamente diferente daquelas observadas nas demais estações do ano (Fig. 8). Em *A. tonsa*, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de HPAs entre as estações amostradas, ou seja, no inverno (6,22 ng.g<sup>-1</sup>), verão (5,71 ng.g<sup>-1</sup>) e outono (7,56 ng.g<sup>-1</sup>). Devido a ausência de *A. tonsa* durante a primavera no estuário da Lagoa dos Patos, não foi possível realizar a análise da concentração de HPAs nesta estação do ano (Fig. 9).

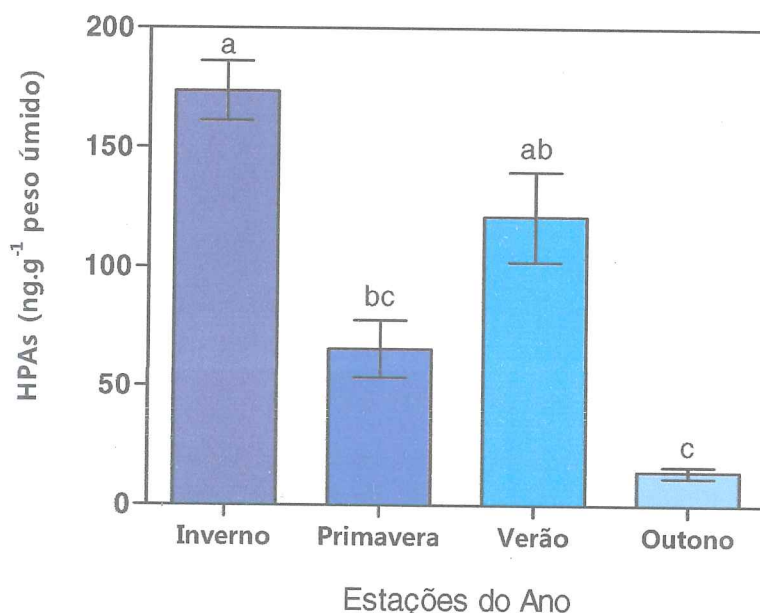


Figura 7: Concentração de HPAs no fígado de *Micropogonias furnieri* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

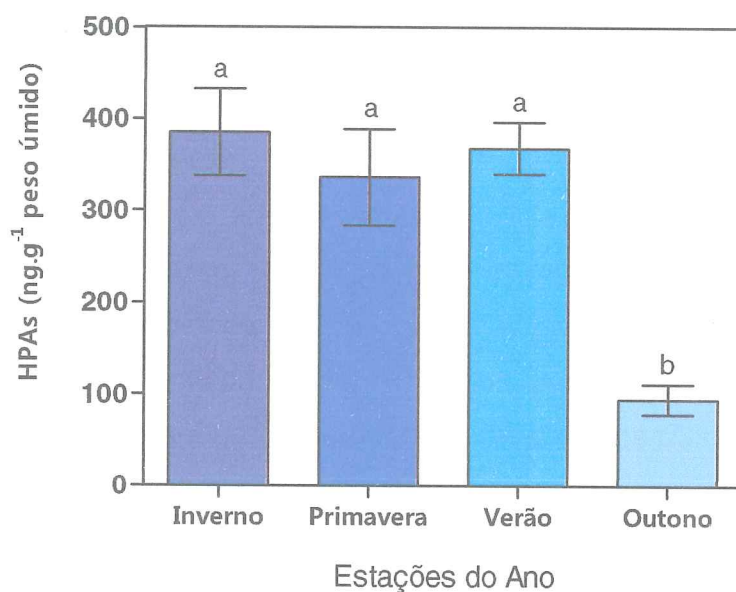


Figura 8: Concentração de HPAs em hepatopâncreas de *Callinectes sapidus* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

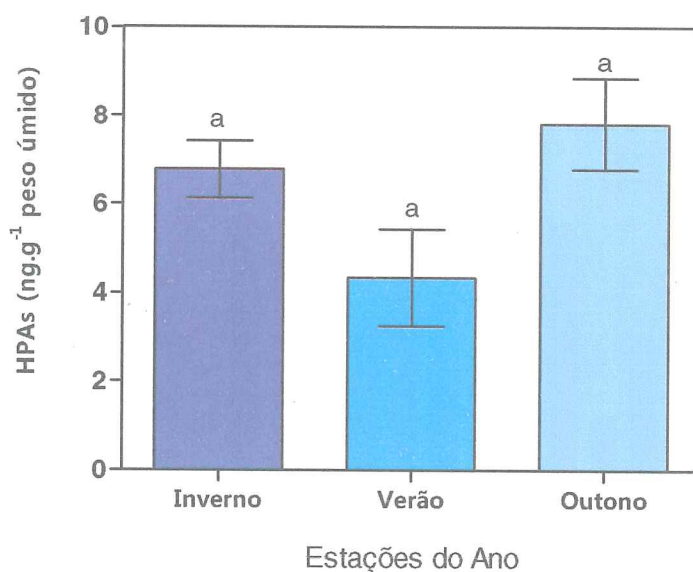


Figura 9: Concentração de HPAs em *pools* de *A. tonsa* nas diferentes estações do ano. Os dados estão expressos como média e as barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Foram identificados 25 diferentes compostos de HPAs para as 3 espécies analisadas. Em *M. furnieri* e *C. sapidus*, o composto que apresentou as maiores concentrações foi o Naftaleno e as menores concentrações foi o Criseno (Fig. 10). As análises realizadas em hepatopâncreas de *C. sapidus* revelaram também a presença de altas concentrações de Benzo(a)Pireno, um dos compostos mais estudados e também mais tóxico para os organismos (Fig. 11). No copépode *A.*

tonsa, as concentrações dos diversos tipos de HPAs foram muito menores do que aquelas observadas para *M. furnieri* e *C. sapidus*, sendo o Fluoreno o composto com maior concentração (Fig. 12).

Para todas as espécies, não foi encontrado um padrão de distribuição dos compostos de 2 e 3 e 4 a 6 anéis aromáticos. A razão entre as concentrações de determinados compostos (e.g. alto/baixo peso molecular) serve para diferenciar as prováveis fontes de contaminação por HPAs, e diversas delas são utilizadas na identificação de fontes poluidoras de HPAs em sedimentos e biota. No entanto, como a bioacumulação de hidrocarbonetos em organismos é complexa e governada por diversos fatores bióticos e abióticos, neste trabalho optou-se por não utilizar as clássicas razões, mas sim o percentual dos compostos de 2 e 3 e 4 a 6 anéis aromáticos em relação à quantidade de HPAs totais encontrados nas amostras (Tabela 6).

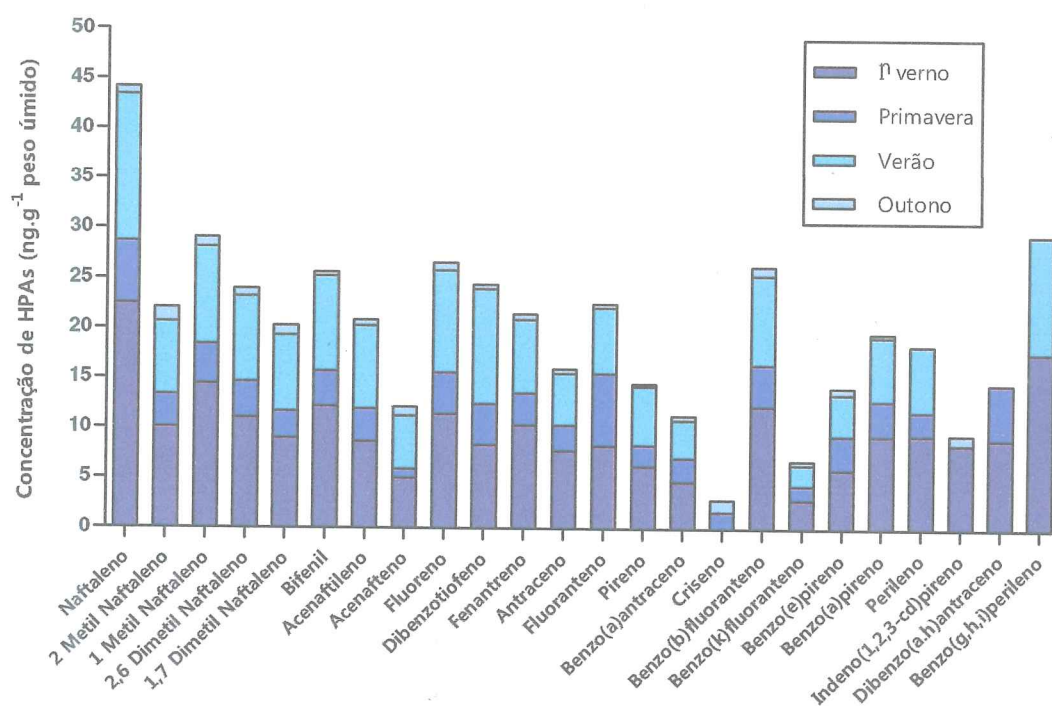


Figura 10: Concentração de HPAs no fígado de *Micropogonias furnieri*, em diferentes estações do ano.

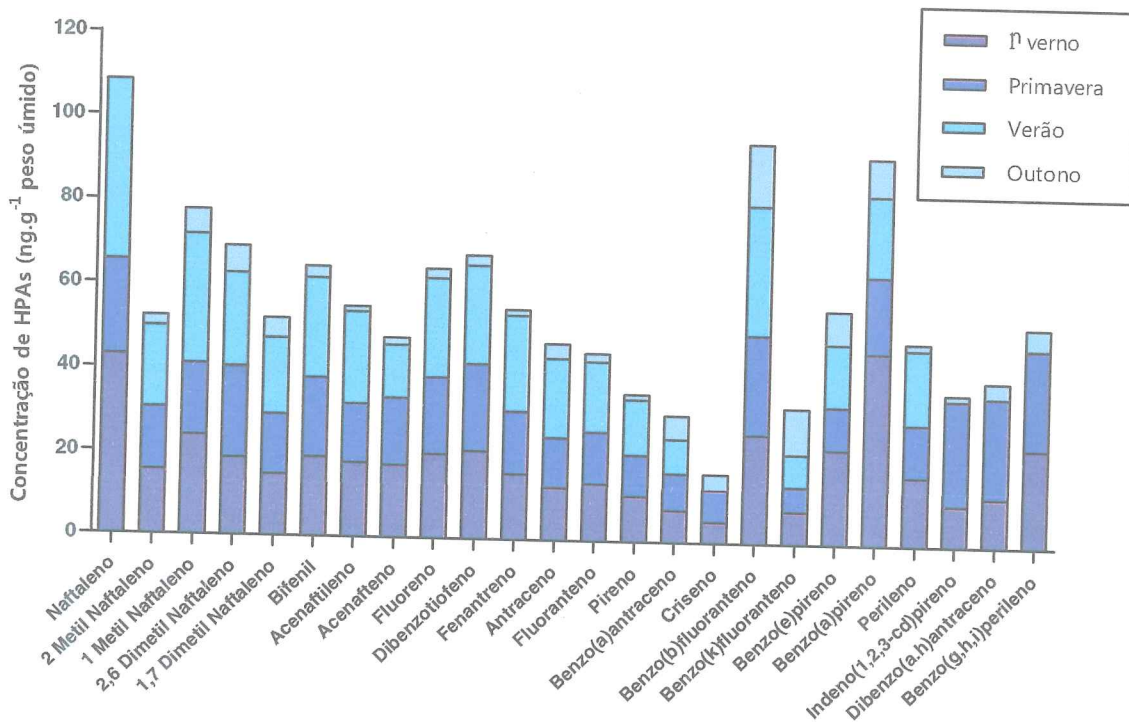


Figura 11: Concentração de HPAs no hepatopâncreas de *Callinectes sapidus*, nas diferentes estações do ano.

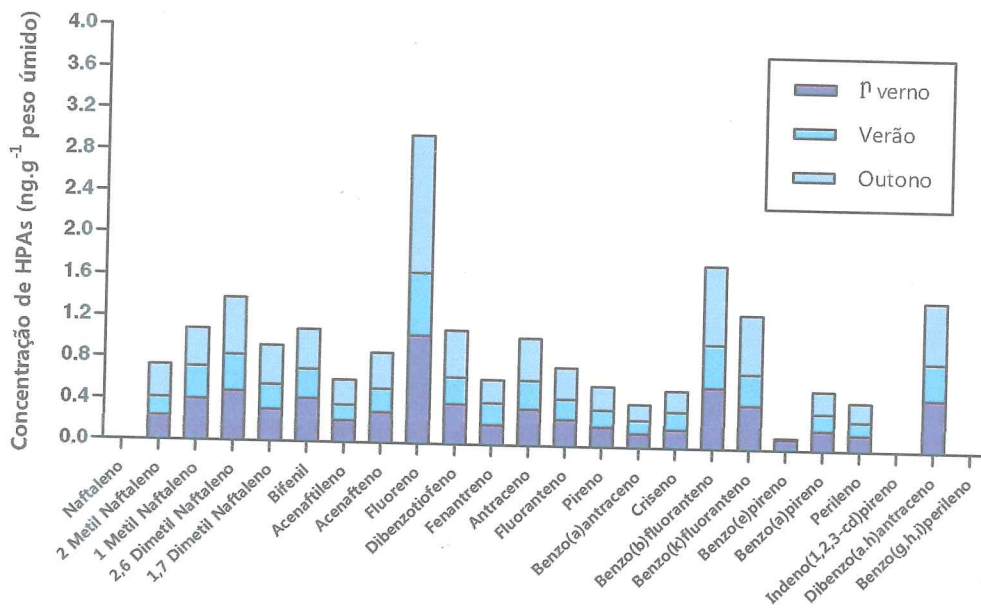


Figura 12: Concentração de HPAs em pools de *Acartia tonsa*, em diferentes estações do ano.



Tabela 6: Percentual de HPAs de 2-3 anéis e de 4-6 anéis aromáticos em relação a quantidade de HPAs totais encontrados nas espécies estudadas nas diferentes estações do ano.

| % dos HPAS de 2-3 e 4-6 anéis por Estação |                               |           |                            |           |                      |           |
|---|-------------------------------|-----------|----------------------------|-----------|----------------------|-----------|
|   | <i>Micropogonias furnieri</i> |           | <i>Callinectes sapidus</i> |           | <i>Acartia tonsa</i> |           |
|   | 2-3 anéis                     | 4-6 anéis | 2-3 anéis                  | 4-6 anéis | 2-3 anéis            | 4-6 anéis |
| <b>Primavera</b>                          | 59,21                         | 40,78     | 54,31                      | 45,68     |                      |           |
| <b>Verão</b>                              | 59,47                         | 40,52     | 70,86                      | 29,13     | 64,10                | 35,14     |
| <b>Outono</b>                             | 59,96                         | 40,03     | 36,96                      | 63,03     | 60,94                | 39,05     |
| <b>Inverno</b>                            | 58,48                         | 41,51     | 58,26                      | 41,73     | 61,09                | 38,9      |

#### 4.4 Relação entre a atividade da EROD e a concentração de HPAs

Com o objetivo de avaliar a relação entre a concentração de HPAs e a atividade da EROD, juntamente com as demais variáveis mensuradas, foi realizada uma análise de regressão múltipla (Tabela 7). Primeiramente, as análises foram realizadas levando-se em consideração a concentração de HPAs totais das amostras. Porém, para uma melhor compreensão dos resultados, a concentração de HPAs foi dividida de acordo com o número de anéis aromáticos presentes no composto. Desta forma, uma nova tabela de regressão múltipla foi elaborada utilizando-se a concentração dos HPAs de 2 e 3 e de 4 a 6 anéis aromáticos (Tabela 8). Em ambas as tabelas (7 e 8) somente estão expressas as correlações significativas, e o valor encontrado para correlação da atividade da EROD com a concentração de HPAs foram incluídos para mostrar que estes não foram significativos.

Tabela 7: Regressão múltipla entre a variável dependente (atividade da EROD) e as variáveis independentes (H= Concentração de HPAs Totais, P= Peso, CP= Comprimento Padrão, CT= Comprimento Total, T=Temperatura, pH= pH, S= Salinidade) AIC = critério de informação de Akaike.

| Análise Regressão Múltipla    |            |                              |        |                |        |
|-------------------------------|------------|------------------------------|--------|----------------|--------|
|                               | Dependente | Variáveis                    |        |                |        |
|                               |            | Independentes                | AIC    | R <sup>2</sup> | p      |
| <i>Micropogonias furnieri</i> | EROD       | H + P + CP + CT + T + pH + S | 196,16 | 0,46           | 0,01   |
|                               |            | H + P + CP + CT + pH + S     | 194,36 | 0,45           | 0,008  |
|                               |            | P + CP + CT + pH + S         | 192,56 | 0,45           | 0,003  |
|                               |            | P + CP + CT + pH             | 190,9  | 0,45           | 0,001  |
|                               |            | CP + CT + pH                 | 189,38 | 0,44           | 0,0006 |
|                               |            | <b>CP + pH</b>               | 188,29 | 0,42           | 0,0002 |
|                               |            | H                            |        | 0,01           | 0,46   |
|                               |            | CP                           |        | 0,15           | 0,02   |
|                               |            | pH                           |        | 0,34           | 0,0003 |
| <i>Callinectes sapidus</i>    | EROD       | H + C + T + pH + S           | 244,85 | 0,271          | 0,06   |
|                               |            | H + C + T + pH               | 242,9  | 0,27           | 0,03   |
|                               |            | C + T + pH                   | 241,25 | 0,26           | 0,01   |
|                               |            | T + pH                       | 240,32 | 0,24           | 0,007  |
|                               |            | T                            | 239,69 | 0,21           | 0,0033 |
|                               |            | H                            |        | 0,09           | 0,06   |
|                               |            | pH                           |        | 0,09           | 0,05   |
| <i>Acartia tonsa</i>          | EROD       | H + T + pH + S               | 79,059 | 0,39           | 0,04   |
|                               |            | H + T + S                    | 77,98  | 0,37           | 0,02   |
|                               |            | H + S                        | 77,38  | 0,33           | 0,017  |
|                               |            | <b>S</b>                     | 76,91  | 0,28           | 0,0083 |
|                               |            | H                            |        | 0,05           | 0,29   |

Tabela 8: Regressão múltipla entre a variável dependente (Atividade da EROD) e as variáveis independentes (HPAs de 2 e 3 e de 4 a 6 anéis aromáticos). (H2-3 = Concentração de HPAs de 2 a 3 anéis, H4-6 = Concentração de HPAs de 4 a 6 anéis, P = Peso, CP = Comprimento Padrão, CT = Comprimento Total, T = Temperatura, pH = pH, S = Salinidade). AIC = critério de informação de Akaike.

| Análise de Regressão Múltipla |               |                                 |               |                |               |
|-------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|----------------|---------------|
| Dep.                          | Variáveis     |                                 | AIC           | R <sup>2</sup> | p             |
|                               | Independentes |                                 |               |                |               |
| H 2-3                         | EROD          | H2-3 + P + CP + CT + T + pH + S | 188,52        | 0,39           | 0,06          |
|                               |               | H2-3 + P + CT + T + pH + S      | 186,54        | 0,39           | 0,03          |
|                               |               | P + CT + T + pH + S             | 184,58        | 0,39           | 0,01          |
|                               |               | P + CT + pH + S                 | 182,72        | 0,39           | 0,007         |
|                               |               | <b>P + pH</b>                   | <b>179,62</b> | <b>0,37</b>    | <b>0,001</b>  |
| <i>Micropogonias furnieri</i> |               | H2-3                            |               | 0              | 0,92          |
| H 4-6                         | EROD          | H4-6 + P + CP + CT + T + pH + S | 154,39        | 0,65           | 0,00005       |
|                               |               | H4-6 + P + CP + T + pH + S      | 152,44        | 0,65           | 0,0001        |
|                               |               | H4-6 + P + CP + pH + S          | 150,76        | 0,65           | 6E-06         |
|                               |               | <b>H4-6 + P + CP + pH</b>       | <b>149,43</b> | <b>0,64</b>    | <b>2E-06</b>  |
|                               |               | H46                             |               | 0,44           | 5E-06         |
| H 2-3                         | EROD          | H2-3 + CT + T + pH + S          | 210,58        | 0,41           | 0,006         |
|                               |               | H2-3 + CT + T + pH              | 208,59        | 0,41           | 0,002         |
|                               |               | H2-3 + CT + T                   | 207,35        | 0,39           | 0,001         |
|                               |               | <b>H2-3 + T</b>                 | <b>206,21</b> | <b>0,38</b>    | <b>0,0004</b> |
| <i>Callinectes sapidus</i>    |               | H2-3                            |               | 0,29           | 0,0008        |
| H 4-6                         | EROD          | H4-6 + CT + T + pH + S          | 225,36        | 0,37           | 0,01          |
|                               |               | CT + T + pH + S                 | 223,36        | 0,37           | 0,004         |
|                               |               | CT + T + pH                     | 221,7         | 0,36           | 0,001         |
|                               |               | T + pH                          | 220,73        | 0,35           | 0,0008        |
|                               |               | <b>T</b>                        | <b>220,14</b> | <b>0,32</b>    | <b>0,0002</b> |
| H 2-3                         | EROD          | H2-3 + T + pH + S               | 79,53         | 0,38           | 0,05          |
|                               |               | H2-3 + T + S                    | 78,31         | 0,36           | 0,03          |
|                               |               | T + S                           | 77,7          | 0,32           | 0,01          |
|                               |               | <b>S</b>                        | <b>76,91</b>  | <b>0,28</b>    | <b>0,008</b>  |
| <i>Acartia tonsa</i>          |               | H4-6 + T + pH + S               | 68,72         | 0,24           | 0,27          |
| H 4-6                         | EROD          | T + pH + S                      | 67,29         | 0,22           | 0,19          |
|                               |               | T + pH                          | 65,96         | 0,2            | 0,11          |
|                               |               | <b>T</b>                        | <b>65,52</b>  | <b>0,14</b>    | <b>0,08</b>   |

As variáveis que apresentaram correlação significativa com a atividade da EROD foram plotadas em gráficos de dispersão, com o intuito de melhor visualização dos resultados.

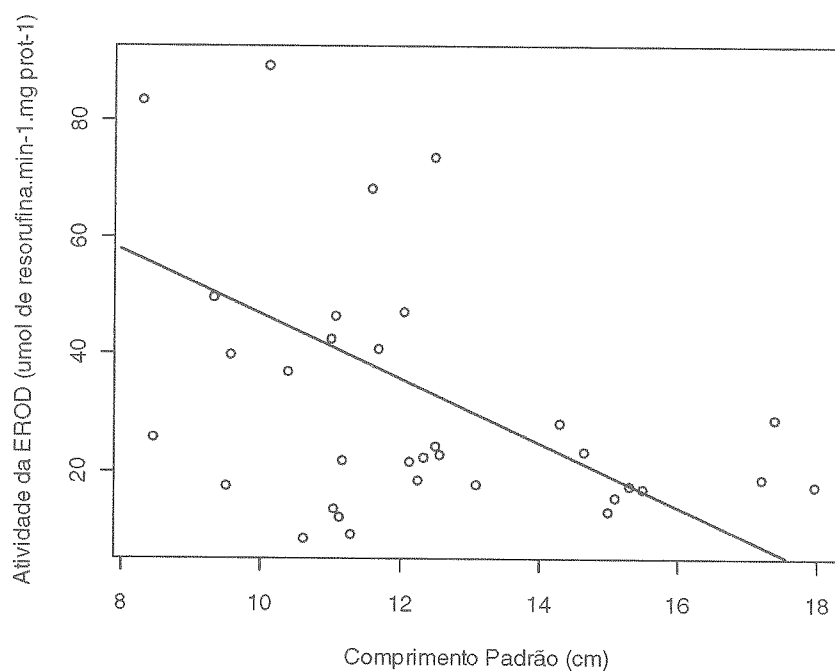


Figura 13: Relação entre a atividade hepática da EROD e o comprimento padrão em *Micropogonias furnieri* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,159$ ).

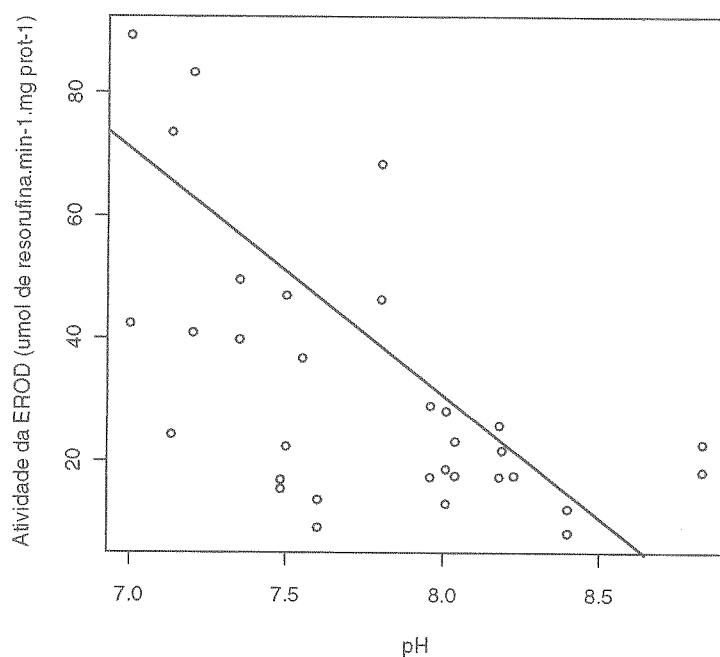


Figura 14: Relação entre a atividade hepática da EROD e o pH da água em *Micropogonias furnieri*. ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,35$ )

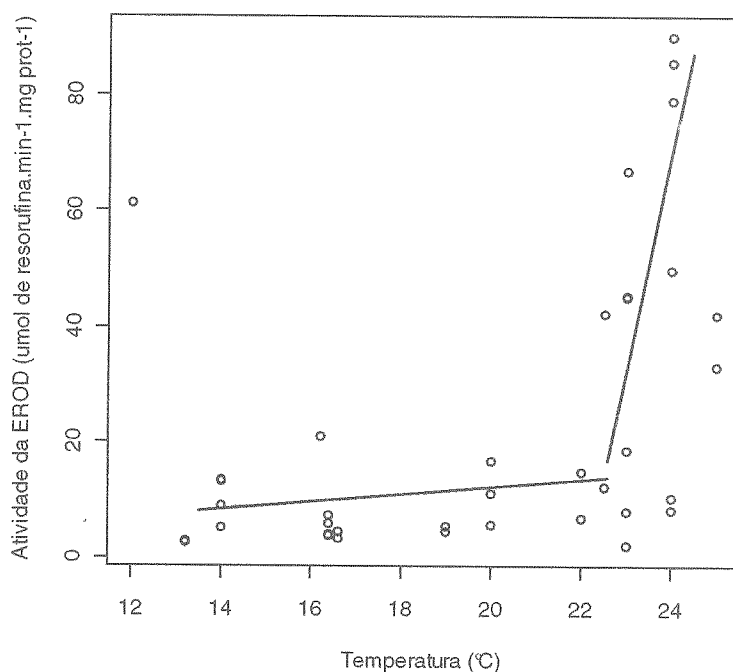


Figura 15: Relação entre a atividade hepatopancreática da EROD e a temperatura da água em *Callinectes sapidus*. ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,21$ ) Breakpoint = 22,80°C.

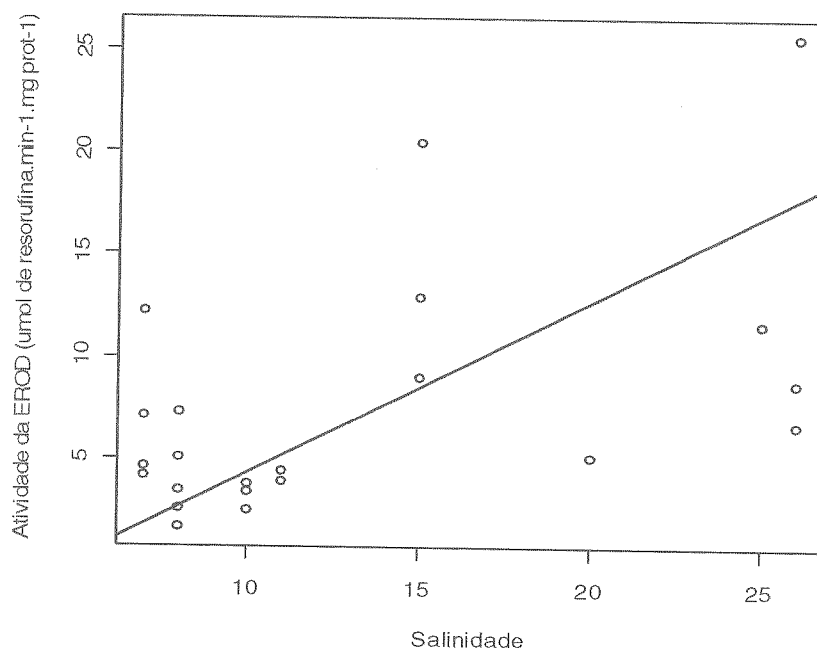


Figura 16: Relação entre a atividade corporal da EROD e a salinidade da água em *Acartia tonsa*. ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,28$ ).

A relação entre a concentração de HPAs de 2 a 3 e de 4 a 6 anéis aromáticos foi plotada em gráficos de dispersão. Pode-se observar que para *M. furnieri* a EROD apresenta correlação significativa somente com os compostos de 4-6 anéis (Fig. 17). Devido ao comportamento da atividade da EROD em função da concentração dos compostos de 4-6 anéis aromáticos, foi realizada uma análise de regressão linear seccionada. Esta análise identificou duas equações que melhor explicam a dispersão dos pontos, bem como um ponto de quebra, ou seja, a concentração de HPAs ( $28,12 \text{ ng.g}^{-1}$ ) onde o comportamento da atividade da EROD é modificada. Neste caso, nas concentrações de HPAs menores que este ponto de quebra a atividade da EROD não se mostra um bom biomarcador, mas, acima deste ponto a atividade desta apresenta-se como um potencial indicador da contaminação por HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos (Fig. 17).

Por outro lado, não foi observada correlação significativa entre a concentração de HPAs e a atividade da EROD nos crustáceos analisados (*C. sapidus* e *A. tonsa*).

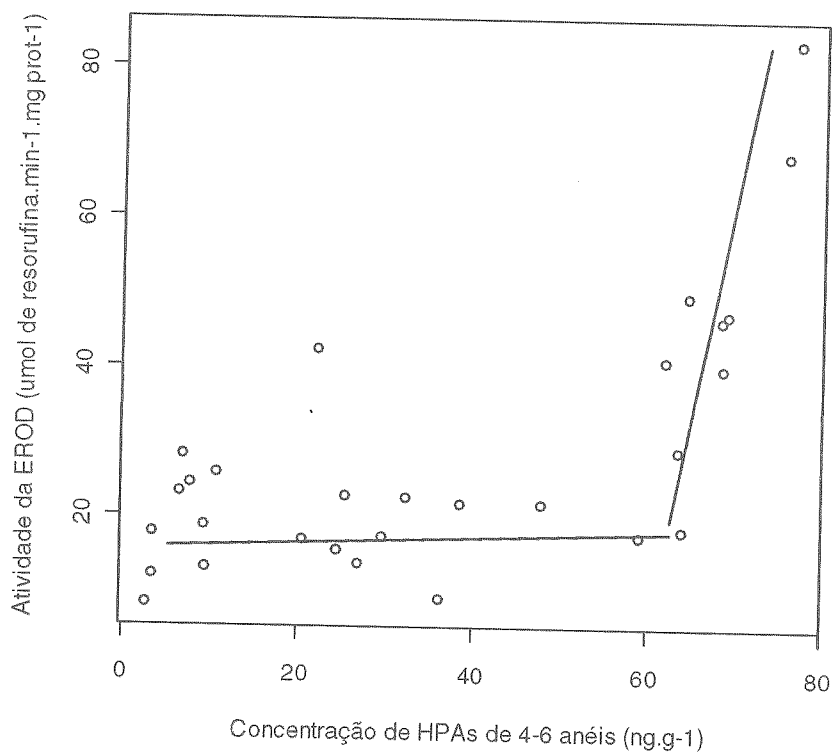


Figura 17: Relação entre a atividade hepática da EROD e a concentração de HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos em *Micropogonias furnieri*. ( $p < 0,05$  e  $r = 0,60$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a região estuarina da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) é constantemente impactada por uma diversidade de contaminantes, e o desenvolvimento de ferramentas que permitam a avaliação dos efeitos deletérios desses contaminantes nos organismos faz-se necessário. Assim, este trabalho avaliou a atividade da 7-etoxiresorufina-*O*-desetilase, um conhecido biomarcador de contaminação por compostos orgânicos planares, em três espécies de relevância ecológica na Lagoa dos Patos.

O metabolismo dos animais aquáticos está diretamente relacionado com condições do meio em que vivem. Parâmetros como temperatura, salinidade e pH exercem grande influência sob os processos regulatórios internos, e, visto que os estuários são ambientes altamente dinâmicos, cabe aos organismos ajustar-se às constantes variações nos parâmetros abióticos que ocorrem nas regiões estuarinas. Esse ajuste demanda uma cascata de reações bioquímicas e respostas fisiológicas, que, quando na presença de algum contaminante, acabam acontecendo de forma irregular e descontínua.

As enzimas da família CYP1A são um sistema de enzimas crucial para a biotransformação de xenobióticos, mas também exercem importante função no metabolismo de várias substâncias endógenas, como na produção de hormônios esteróides e no metabolismo de ácidos graxos. Portanto, a atividade da EROD pode ser influenciada por um grande número de fatores bióticos e abióticos, tais como temperatura da água, idade do animal e estágio reprodutivo. Uma compreensão da influência desses fatores nas respostas biológicas é, portanto, crítica para o entendimento dos dados provenientes de estudos de campo que utilizem este biomarcador (ANDERSSON & FORLIN, 1992). Por estas razões, integrada à atividade da EROD é necessária a avaliação da possível influência das condições ambientais, bem como das características individuais dos organismos na resposta do biomarcador em questão.

Quando os dados obtidos para as três espécies estudadas foram relacionados com os dados biológicos e os parâmetros ambientais, estes apresentaram, em alguns casos, uma influência sobre a resposta do biomarcador. Em *M. furnieri*, a atividade da EROD apresentou uma relação significativa com o pH da água (Fig. 14) e também com o comprimento padrão do peixe (Fig. 13). A relação



negativa entre o comprimento padrão e a EROD mostra que quanto maior o peixe, menor a atividade desta enzima, sugerindo que animais maiores possuem menor capacidade de destoxificação, devido a uma diminuição do metabolismo, em relação a animais menores. De fato, os estágios iniciais de desenvolvimento parecem ser particularmente sensíveis aos ligantes do receptor AhR em peixes (WALKER e PETERSON, 1991).

Para *C. sapidus*, as alterações na atividade da EROD não estão correlacionadas com as variáveis abióticas e bióticas analisadas. Foi observado apenas um aumento da atividade da EROD em temperaturas mais elevadas (acima de 22 °C).

*Acartia tonsa* é considerado um copépode cosmopolita e bastante resistente a variações de salinidade (MONTÚ e GOEDEN, 1986). No entanto, quando o seu ótimo de salinidade não é atingido, um estresse iônico e osmótico é gerado, podendo alterar a atividade de complexos enzimáticos. No presente estudo, a variação da atividade da EROD em *A. tonsa* apresentou uma relação positiva com a salinidade, ou seja, a atividade enzimática aumentou com o aumento da salinidade. Considerando que não houve correlação entre a concentração corporal de HPAs e a atividade corporal da EROD em *A. tonsa*, a variação na atividade enzimática nas estações amostradas pode ser explicada, portanto, pelas mudanças na salinidade da água. Cailleaud *et al.* (2007) avaliaram a relação da salinidade e temperatura na variação de biomarcadores conhecidos (Acetilcolinesterase e Glutathione S-transferase), utilizando o copépode *Eurytemora affinis*. Foi observado neste estudo que a salinidade também exerceu um efeito relevante na atividade de ambos complexos enzimáticos, sendo que a temperatura pareceu não ser um fator determinante para tal resultado.

Recentemente, Leguen (2010) demonstrou que a atividade da EROD em *Onchorhynchus mykiss* (truta arco-íris) é induzida pela variação abrupta da salinidade (choque hiperosmótico), como uma tentativa de aclimação às novas condições ambientais. No entanto, no presente estudo realizado com indivíduos coletados em campo não foi observada uma influência significativa da salinidade da água na atividade da EROD, sugerindo que apenas variações abruptas de salinidade induzem a atividade deste biomarcador em peixes.

A contaminação por hidrocarbonetos no estuário da Lagoa dos Patos é difusa, ou seja, várias são as fontes potenciais desses contaminantes para a região. Por ser

uma área de extensa atividade antrópica, possuindo um dos maiores complexos portuários do país, a região sofre diariamente com o impacto da contaminação por óleos. Além disso, os esgotos domésticos e industriais que são lançados em sua maioria sem tratamento, contribuem com uma grande parte dos danos causados pela poluição por hidrocarbonetos.

Hidrocarbonetos petrogênicos possuem um percentual de compostos de 2 e 3 anéis maior do que a porcentagem dos compostos de 4 a 6 anéis aromáticos. Estes, quando se apresentam em quantidade elevada, caracterizam origem pirolítica. As amostras analisadas neste trabalho não apresentaram diferenças marcantes quanto ao percentual de compostos de 2 e 3 ou 4 a 6 anéis. Portanto, de uma forma geral, pode-se dizer que os hidrocarbonetos analisados neste trabalho, que correspondem a uma média anual da contaminação na Lagoa dos Patos, são provenientes de fontes mistas.

A acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos organismos marinhos pode-se dar através de diferentes vias. A captação pelos organismos está diretamente relacionada com a biodisponibilidade dos compostos, que por sua vez, está associada à solubilidade em água. Portanto, compostos mais solúveis são captados mais através da água, enquanto os menos solúveis, que se agregam a partículas, são incorporados principalmente através da alimentação. A bioacumulação de HPAs pelos organismos a partir do sedimento é geralmente maior para os compostos de alto peso molecular e menos solúveis, do que para os de baixo peso molecular, visto que estes se agregam às partículas em suspensão e são facilmente depositados. Outros fatores que exercem grande influência na acumulação de HPAs nos organismos são o hábito alimentar, bem como a composição da dieta (BAUMARD, 1998). Assim como para os fatores abióticos discutidos acima, a bioacumulação de HPAs depende também do desenvolvimento do animal e da capacidade que este possui de biotransformar certos compostos, sendo que quanto maior o nível trófico, maior a capacidade de destoxificação do animal (LIVINGSTONE, 1992).

As concentrações de HPAs encontrados para o copépode *A. tonsa* estão acima daquelas relatadas por Pane *et al.* (2005), para uma região portuária conhecidamente poluída da Itália. *A. tonsa* não apresentou naftaleno acumulado em seus tecidos. O naftaleno é o composto mais leve e mais solúvel em água, ou seja, não se agrega em partículas em suspensão. Visto que o copépode se alimenta de

pequenas partículas, especialmente fitoplâncton, era esperado, de fato que os compostos mais solúveis não fossem encontrados em alta quantidade. Além disso, Cailleaud *et al.* (2009) em experimentos de laboratório observou que o copépode *Eurytemora affinis* possui maior capacidade de eliminar os compostos de baixo peso molecular e de acumular os de maior peso molecular, complementando os dados encontrados neste trabalho. Por outro lado, o Fluoreno foi o composto que se apresentou em maior concentração no copépode *A. tonsa*, indicando que existe alguma fonte específica de contaminação deste composto.

Com relação à outra espécie de crustáceo avaliada no presente estudo, o siri-azul *C. sapidus*, foram observadas concentrações elevadas de HPAs Np hepatopâncreas. Estes resultados podem estar associados ao maior teor lipídico que este tecido possui. Além disso, cabe ressaltar que o mecanismo de biotransformação dos crustáceos não é tão desenvolvido com relação a estes poluentes quanto aquele presente nos vertebrados (SNYDER, 2000)

De uma forma geral, as variações na atividade hepatopancreática e corporal da EROD em *C. sapidus* e *A. tonsa* podem ser explicados por alterações nos parâmetros abióticos, tal como uma estimulação a altas temperaturas em *C. sapidus*, e a salinidade (*A. tonsa*). Além disso, não foram observadas correlações significativas entre as concentrações de HPAs e a atividade da EROD, indicando que este parâmetro bioquímico não se constitui em uma potencial ferramenta biomarcadora para monitoramento de contaminação por hidrocarbonetos na biota do estuário da Lagoa dos Patos (RS).

A ausência de correlações significativas entre as concentrações de HPAs, tanto de 2 e 3 quanto de 4 a 6 anéis em *C. sapidus* e *A. tonsa*, pode estar relacionada, não só devido a influência de variáveis abióticas na atividade enzimática, mas também pelo fato de que as respostas da CYP1A são geralmente muito baixas em crustáceos (JAMES e LITTLE, 1984). Por exemplo, Sundt (1998) não encontrou respostas da CYP1A em caranguejos expostos ao benzo(a)pireno, e atribuiu esta ausência de resposta à falta do receptor AhR, componente essencial para o metabolismo de HPAs em vertebrados.

Com relação a espécie de peixe avaliada no presente estudo, a corvina *M. furnieri* possui hábito demersal, ou seja, não é considerado um peixe bentônico, mas vive associado ao fundo. Esse comportamento pode explicar a concentração de hidrocarbonetos de alto peso molecular (4 a 6 anéis) encontrada. Como essa

espécie é onívora e consome uma variedade de presas, os hidrocarbonetos podem ser facilmente ingeridos junto com a alimentação. No entanto, também foram encontradas concentrações de hidrocarbonetos de baixo peso molecular, provavelmente incorporados durante a respiração e natação. Uma análise mais detalhada de HPAs nas brânquias, que é o primeiro órgão de contato com o ambiente externo, poderia elucidar esta hipótese.

De acordo com os dados apresentados neste trabalho, a atividade da EROD em *M. furnieri* apresentou uma relação negativa com o pH da água superficial. Diminuições no pH acarretam em um aumento da ventilação em peixes teleósteos, e conseqüentemente em um aumento no consumo de oxigênio (SCHMIDT e NIELSEN, 2002). A diminuição do metabolismo poderia explicar a diminuição da atividade da EROD encontrada para *M. furnieri*.

Através dos resultados obtidos no presente estudo pode-se observar que a atividade da EROD em *M. furnieri* foi claramente induzida pelos compostos de alto peso molecular (Fig 17) a partir da concentração de 28,12 ng.g<sup>-1</sup>. Um estudo realizado por Gravato e Santos (2002) utilizando o peixe *Dicentrarchus labrax* (robalo) mostrou que, quando expostos a compostos de diferentes pesos moleculares, a atividade da EROD era induzida preferencialmente pelo benzo(a)pireno (alto peso molecular), e não apresentou resposta quando exposta ao naftaleno (baixo peso molecular). A alta concentração de naftaleno encontrada nas amostras de *M. furnieri* e *C. sapidus* poderia explicar a baixa correlação observada entre o somatório da concentração dos HPAs e a atividade da EROD. Além disso, alguns trabalhos indicam que o naftaleno não é um bom agonista para o AhR, o que reforça a ausência de correlação entre o somatório da concentração de HPAs e a atividade da EROD (GRAVATO e SANTOS, 2002)

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que a atividade hepática da EROD em *M. furnieri* apresenta-se como um bom biomarcador de contaminação por HPAs de alto peso molecular na região estuarina da Lagoa dos Patos (RS). Cabe ressaltar que esta afirmativa leva em consideração alterações de parâmetros abióticos frequentemente observados no estuário da Lagoa dos Patos (RS) em função das estações do ano, bem como dados biométricos dos indivíduos analisados evidenciando assim a robustez da atividade hepática da EROD como potencial ferramenta no monitoramento da exposição de hidrocarbonetos neste ambiente estuarino.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A atividade hepática da EROD na corvina *M. furnieri* apresentou-se como um potencial biomarcador de contaminação por hidrocarbonetos de alto peso molecular.

Por outro lado, os resultados obtidos para as duas espécies de crustáceos estudadas indicam que a atividade da EROD é influenciada tanto por fatores biológicos quanto parâmetros abióticos, não se constituindo, portanto, em um bom biomarcador de contaminação por HPAs na Lagoa dos Patos (RS). Considerando o fato de que não houve uma resposta da atividade da EROD em função do nível de acumulação de HPAs (baixo e alto peso molecular) nos crustáceos estudados, recomenda-se futuramente a utilização de ferramentas genéticas, com o intuito de mapear os genes e pseudogenes envolvidos na biotransformação de xenobióticos neste grupo de animais.

Finalmente, com vistas a evidenciar e melhor caracterizar a influência de parâmetros abióticos sobre a atividade da EROD e reforçar o papel desta como biomarcador de exposição a HPAs de alto peso molecular, recomenda-se a realização de ensaios toxicológicos em laboratório.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, T. e FORLIN, L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 4, p. 1-20.
- ANDRADE, C. F. F. **Avaliação *in situ* da especiação química de metais traço no estuário da Lagoa dos Patos utilizando o sistema DGT**. 86 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química Física e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.
- BAUMGARTEN, M.G.Z.; NIENCHESKI, L.F. 1998. **Avaliação da qualidade hidroquímica da área portuária da cidade de Rio Grande - RS**. Rio Grande: Editora Furg. pp. 5-66. Documento Técnico.
- BIHARI N.; BATEL, R.; KERELEC, B. e ZAHN, R. K., 1984. Tissue distribution, seasonal variation and induction of B(a)pyrene monooxygenase activity in the crab *Maja crispata*. **Science of the Total Environment**, v. 35, p. 41-51.
- BOESCH, D. F.; RABALAIS, N.N. **Long-Term environmental effects of offshore oil and gas development**. New York: Elsevier Science, 1987.
- BURGEOT, T., BOCQUÉNÉ, G.; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L. M.; PIHOL-LESZKOWICKZ, A.; RAOUX, C. e GALGANI, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 131, p. 125-141.
- CAILLEAUD, K. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). **Comp. Biochem. Phys.**, v. 147, p. 841-849.
- CAILLEAUD, K.; BUDZINSKI, H.; LE MENACH, K.; SOUISSI, S.; FORGET-LERAY, J., 2009. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: An experimental study. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 18, p. 239 – 246.
- CAPITOLI, R. R.; BEMVENUTI, C. E.; GIANUCA, N. M. 1978. Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. **Atlântica**, Rio Grande, v. 3, p. 5-22.

CARLBERG, S.R. Oil polluting the marine environment – with an emphasis on estuarine studies. In: OLAUSSON, E. & CATO, I. **Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries**. Chichester: John Wiley & Sons, 1980. p. 367-400.

CASTELLO, J. P. La ecología de los consumidores del estuario de la Lagoa dos Patos. In: YAÑEZ-ARANCIBIA, A. **Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration**. Mexico: UNAM Press, 1985, p. 386-406.

CASTELLO, J. P. (1986). Distribuição, crescimento y maturación sexual de la corvina juvenil (*Micropogonias furnieri*) en el estuário de la "Lagoa dos Patos", **Physis**. Brasil, v. 44, p. 21-36.

CASTELLO, J.P., 2005. Uso e Apropriação dos Recursos Costeiros - Projeto Recos Instituto do Milênio. **Technical Report 01**, FURG: Oceanography Department, Rio Grande.

CLARK, R.B. **Marine Pollution**, 3.Oxford: Clarendon Press, 1992.

CORMACK, D., Response to Oil and Chemical Marine Pollution, **Applied Science Publishers**, Londres, 1983.

EGGENS, M.L., GALGANI, F. 1992. Ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Mar. Environ. Res.** 33, 213-221.

EGGENS, M.L., BERGMAN, D.; VETHAAK, M.; VAN DER WEIDEN, M.C. e BOON, J.P., 1995. Cytochrome P450 1A indices as biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with plaice, *Pleuronectes platessa* and flounder, *Platichthys flesus*, from the southern North Sea. **Aquat. Toxicol.**v. 32, p. 211-225.

FERNANDES, E. H. L.; DYER, K. R.; MÖLLER, O. O. 2003. Morphological influence on the formation of spatial gradients in the southern Patos Lagoon. In: SYMPOSIUM ON RIVER, COASTAL AND ESTUARINE MORPHODYNAMICS. 3, 2003, Barcelona, Espanha. **Proceedings...** Espanha. p. 504-515.

FILLMANN, G.; WATSON, G.M.;HOWSAM, M.; FRANCIONI, E.; DEPLEDGE, M.H.; READMAN, J.W., 2004. Urinary PAH metabolites as biomarkers of exposure in aquatic environments - applicability of immunochemical techniques. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 2649-2656

FOSSI, M.C.; LARI, L.; CASINI, S.; MATTEI, N.; SAVELLI, C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CASTELLANI, S.; DEPLEGGE, M.; BAMBER, S.; WALKER, C.; SAVVA, D. e SPARAGANO, O., 1996. Biochemical and genotoxic biomarkers in the Mediterranean crab *Carcinus aestuarii* experimentally exposed to polychlorobiphenils, benzopyrene and methyl-mercury. **Mar. Environmental research**, v. 42, p. 29-32.

FOSSI, M.C.; CASINI, S.; MARSILI, L.; NERI, G.; MORI, G.; ANCORA, S.; MOSCATELLI, A.; AUSILI, A. e NOTARBARTOLO-DI-SCIARA, G., 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 667-671.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol**, v. 22, p. 287-312.

GOKSOYR, A.; BEYER, J.; HUSOY, A.; LARSEN, H.E.; WESTRHEIM, K.; WILHEMSEM, S. e KLUNGSOYR, J., 1994. Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). **Aquat. Toxicol.**v. 29, p. 21-35.

JAMES, M. O., LITTLE, P. J., 1984. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 78, p. 241-245.

KENNISH, M.J. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1996.

KUTLU, M., SUSUZ, F. 2004. Effects of lead as an environmental pollutant on EROD enzyme in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 72, p. 750-755.

LAW, R.J.; BISCAYA, J.L. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 29, p. 235-241.

LEHNINGHER, A., NELSON, D. L., COX, M. M., **Princípios de Bioquímica**. 4, W.H. Freeman, 2005.



LIVINGSTONE, D. R., 1992. Persistent pollutants in marine invertebrates. In **Persistent Pollutants in Marine Ecosystems**, eds C. H. Walker and D. R. Livingstone, pp. 3-34. Pergamon Press, Oxford.

LIVINGSTONE, D.R. 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome C reductase activity and cytochrome P450 in digestive glands of *Mytilus edulis* e *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. **Marine Ecology and Progress Series**, v. 46, p. 37-43.

LIVINGSTONE, D.R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: HOULIHAN, D. F.; LIVINGSTONE, D.R.; LEE, R.F. **Advanced in comparative and environmental physiology**. Germany, Springer-Verlag, 1991. p. 45-185

LIVINGSTONE, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** v. 57, p. 195-211.

MANTEL, L.H.; FARMER, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: VERNBERG, F.J.; VERNBERG, W.B. **The Biology of Crustacean**, New York, Acad. Press., v. 5, p. 53-161.

McVEETY, B.D.; HITES, R.A. 1988. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces: A mass balance approach. **Atmospheric Environment**, v. 22, p. 511-536.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 1996.

MILLER, C.A. **Effects of food quality and quantity on nitrogen excretion by the copepod *Acartia tonsa***. Dissertação (Doutorado Oceanografia Biológica) – Universidade de Maryland, EUA, 1992.

MIRLEAN, N., ANDRUS, V.E., BAISCH, P., 2003. Mercury pollution sources in sediments of Patos Lagoon Estuary, Southern, Brazil. **Mar. Pol. Bull.**, v. 43, p.331-334.

MÖLLER, O.O.; LORENZZETTI, J.A.; STECH, J.L. e MATA, M.M., 1996. The Patos Lagoon summertime circulation and dynamics. **Continental Shelf Research**, v. 16, p. 35-351.

MÖLLER, O. O.; CASTAING, P. Hydrological characteristics of the estuarine area of Patos Lagoon (301S, Brazil). In: PERILLO, G.M.E.; M.C. PICCOLO. **Estuaries of South America (their Geomorphology and Dynamics)**. Berlim: Environmental Science. 1999. p. 83-100.

MONTÚ, A.M. 1980. Zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos - Estrutura e variações temporais e espaciais da comunidade. **Atlântica**, v. 4, p. 53-72

MONTÚ, A. M.; GOEDEN, I. 1986. Atlas dos Cladocera e Copepoda (crustacean) do Estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, Brasil). **Nerítica**, v. 1(2), p.1-134.

NEFF, J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: Sources, fates, and biological effects. **Applied Science Publishers**, London, UK. 262 p.

NEFF, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R., **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. New York: Hemisphere Publ. Corp., 1985. p. 416-454.

NEWMAN, M.C. **Fundamentals of Ecotoxicology**. Chelsea: Ann Arbor Press., 1988.

NIENCHESKI, L.F., FILLMANN, G. Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. In.: Lana, P.C., *et al.*, **Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. Cap. 4, p 63-118.

OLIVEIR, A.; PINTO, T.K.; SANTOS, D.P.D. e D'INCAO, F., 2006. Dieta natural do siri-azul *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul, **Iheringia, Sér. Zool.** v.96, n.3. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=0073-4721&script=sci\\_issues](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=0073-4721&script=sci_issues)>. Acesso em: 20/05/2010.

OTTO, D.M.E., MOON, T.W., 1996a. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. **Fish Physiol. Biochem.** v. 15, p. 349-358.

PANE, L.; BOCCARDO, S.; BONFIGLIONI, F.; MARIOTTINI, G.L.; PRIANO, F. e CONIO, O., 2005. Polycyclic aromatics hydrocarbons in water, seston and copepods in a harbor area in the western Mediterranean (Ligurian Sea). **Marine Ecology**, v. 26, p. 89-99.

- PAYNE, J.F.; BAULD, C.; DEY, A.C.; KICENIUK, J.W. e WILLIAMS, U., 1984. Selectivity of mixed-function oxygenase enzyme induction in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) collected at the site of the Baie Verte, Newfoundland oil spill. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 79, p. 15-19.
- PILLER, S. C. 1995. A comparison of the gill of two euryhaline crab species *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 349-458.
- READMAN, J.W., MANTOURA, R.F.C., and RHEAD, M.M. (1984). The physicochemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aquatic systems. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 319, p. 126-131.
- REIS, E.G.; D'INCAO, F. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. **Ocean Coast. Manag.**, v. 43, p. 585-595.
- RICCIARDI, F. *et al.*, 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs *Carcinus aestuarii* from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. **Water Research**, v. 44, p. 1725 – 1736.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A.; DORADO, G. e NAVAS, J.I., 1994. Promutagen activation by fish liver as a biomarker of littoral pollution. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 24, p. 116-123.
- SHAILAJA, M. S.; D'SILVA, C. 2003. Evaluation of impact of PAH on tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. **Chemosphere**, v. 53, p. 835-841.
- SNYDER, M. J., 2000. Cythochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 529-547.
- STEGEMAN, J. J., HAHN, M. E., 2003. Phylogenetic distribution of the Ah receptor in non-mammalian species: implications for dioxin toxicity and Ah receptor evolution. **Chemosphere**, v.25, p. 931-937.
- STROOMBERG, G.J., *et al.* 1996. Formation of pyrene metabolites by the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. **Chemosphere**, v. 33, p. 1905-1914.

SUNDT, H., GOKSOYR, A., 1998. and In Vivo and in V&o Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Edible Crab, *Cancer pagurus*. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 515-519.

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

TIMME-LARAGY, A.R. *et al.*, 2007. Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 241-250.

TOPIN, L. O. M.; SOUZA, J. A. F. 1982. Estudo preliminar sobre três espécies de *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) da área estuarial da Lagoa dos Patos e costa riograndina, RS. **Atlântica**, v. 5 (2), p. 121.

VAN DER OOST, R.; LOPES, S.C.C. e KOMEN, H., 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*); use of a bioactivation:- detoxication ratio as biotransformation index (BTI). **Mar. Environ. Pollut.** v. 46, p. 315-319.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149.

VAZZOLER, A. E. A. M. 1991. Síntese de conhecimentos sobre a biologia da corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil. **Atlantica**, v. 13, n. 1, p. 55-74.

VIEIRA, J. P.; CASTELLO, J. P.; PEREIRA, L. E.. Ictiofauna. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. **Os Ecossistemas Costeiros e Marinho do Estremo Sul do Brasil**. Rio Grande: Ecoscientia, 1998. p. 341.

WALKER, M. K., PETERSON, R.E., 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat Toxicol** v. 21 n.2 p. 19-238

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.I.; SIBLY, R.M. e PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996.

WHO, International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva: Environmental Health Criteria, 1993. p. 155.

WHYTE, J.J. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Crit. Rev. Toxicol**, v. 30, 347-570.

WILLIAMS, A. H. 1974. The swimming crabs of genus *Callinectes* (Decapoda, Portunidae). **Fish Bulletin**, v. 72 n.3, p. 685-798.

WITT, G. 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 237-248.