



Fundação Universidade Federal do Rio Grande



Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica.

Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática



O USO DA ESPÉCIE *Callinectes sapidus* NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DA FRAÇÃO BIODISPONÍVEL DE HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS (HPAs)

Oc. Luiz Henrique Capotorto Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.

Orientador: Dr. Gilberto Fillmann

Rio Grande

Julho 2005

AGRADECIMENTOS

Nestes últimos anos muitas pessoas contribuíram para a minha formação e, de forma direta ou indireta, tiveram participação nesta etapa da minha vida. Desta forma, não posso deixar de agradecer:

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio, incentivo e compreensão pela minha ausência em momentos importantes de suas vidas.

Ao meu orientador, Dr. Gilberto Fillmann, que tantas vezes “bati de frente”, mas sempre ciente de que estava aprendendo muito com seus anos de experiência.

A todos os colegas do CONECO, onde passei a maior parte destes dois anos, que fizeram daquele laboratório um lugar inesquecível, que guardarei com muito carinho.

Ao Oc. Hebert Broedel por todo apoio durante os experimentos e amizade em tempos difíceis.

Ao Prof. Gilberto Griep e Dra. Isabel Machado pela oportunidade de participar do PRH-027 e aprender um pouco sobre o mundo do petróleo, além do apoio financeiro da ANP.

Ao Lab. de Crustáceos Decápodes e EMA pelo apoio logístico.

Ao Prof. Walter Stefani e equipe por permitir o uso do Espectrofluorímetro do Depto. de Química Orgânica da UFRGS, adquirido com recursos da FAPERGS.

Ao pescador Serginho, grande figura de apoio à dissertação e pessoa de grande coração.

Aos membros da banca examinadora Dr. Jose Maria Monserrat e Dra. Eleine Francioni Lima pelas sugestões e apoio tanto em assuntos relacionados à tese como fora desta.

“Por detrás das nuvens de pensamentos, dentre estas nuvens pesadíssimas carregadas de emoções e calcadas em hábitos arraigados, brilha continuamente uma inteligência terna, brilhante e afável.... a busca continuasempre!”

Referência: Sakyamuni, B. ±500 aC modificado por Barbosa, L.H.C. 2005 dC.

Queres pérolas, mergulhes no mar!

Provérbio Curdo.

LISTA DE ABREVIATURAS

- HPAs-Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.
- ELP-Estuário da Lagoa dos Patos.
- MFO-Oxigenase de Função Mista.
- B(a)p-Benzo(a)pireno.
- *C. sapidus-Callinectes sapidus.*
- *C.maenas-Carcinus maenas.*
- FF-Espectrometria de comprimentos de onda fixos.
- SFS-Espectrometria de fluorescência sincrônica.
- HPLC-Cromatografia Líquida de Alta Resolução.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Cinética, biodisponibilidade e efeitos gerados pela exposição de contaminantes. Fonte: Fent, 2003.</i>	4
<i>Figura 2. Rota de excreção apresentada por xenobióticos naturais e poluentes em organismos marinhos.</i> <i>Fonte: Modificado de Livingstone, 1991.</i>	16
<i>Figura 3. Callinectes sapidus, a espécie selecionada para o estudo.</i>	20
<i>Figura 4. Área de coleta dos organismos.</i>	22
<i>Figura 5. Procedimento de amostragem de urina.</i>	24
<i>Figura 6. Padrão de resposta obtido pela leitura das amostras de urina.</i>	30
<i>Figura 7. Padrão de resposta obtido pela leitura das amostras de urina e padrões de 1-OH pireno.</i>	30
<i>Figura 8. Delimitação dos picos utilizados na quantificação.</i>	31
<i>Figura 9. Padrão de resposta para amostras de urina de organismos controle e expostos a pireno (100 µg.L⁻¹).</i> <i>l).</i>	32
<i>Figura 10. Influência da diluição na intensidade de fluorescência (FF) medida em urinas de siris fortificadas com 1-OH pireno (25, 50 e 100 µg.L⁻¹).</i>	33
<i>Figura 11. Paralelismo indicando ausência de efeito matriz nas amostras de urina diluídas 30X (Reta Pontilhada - amostras fortificadas com 1-OH pireno; Reta Contínua - padrões de 1-OH pireno).</i>	33
<i>Figura 12. Metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) detectados em urina de organismos expostos a pireno (10, 25 e 50 µg.L⁻¹).</i>	34
<i>Figura 13. Metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) detectados em urina de organismos expostos a pireno (100 e 200 µg.L⁻¹).</i>	34
<i>Figura 14. Concentração média (e intervalo de confiança; α=0,05 e n=4-8 amostras por tratamento) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de organismos após 24 horas de exposição a pireno (0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg.L⁻¹).</i>	36
<i>Figura 15. Concentração média (e intervalo de confiança; α=0,05 e n=5-8 amostras por tratamento) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de organismos após 48 horas de exposição a pireno (0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg.L⁻¹).</i>	37
<i>Figura 16. Concentração média (e intervalo de confiança; α=0,05) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de Callinectes sapidus ao longo de 10 dia após a</i>	

<i>exposição inicial a pireno (Controle - n=7-15 amostras por experimento; 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - n=4-8 amostras por experimento; 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - n=10-6 amostras por experimento).</i>	38
<i>Figura 17. Representação dos metabólitos excretados pela espécie C. maenas exposta a diferentes concentrações de Pireno. Fonte: Fillmann et al. (2002).</i>	42

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Características apresentadas por alguns HPAs.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 2. Principais fontes de HPAs na atmosfera e ambiente aquático (Modificado de Kennish, 1997).</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 3. Quadro comparativo entre as espécies C. sapidus e C. maenas.</i>	<i>46</i>

ÍNDICE

1	<i>Abstract</i>	1
2	<i>Resumo</i>	2
3	<i>Introdução</i>	3
3.1	Aspectos gerais	3
3.2	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	6
3.2.1	<i>Processos de transformação de HPAs no meio marinho</i>	9
3.2.2	<i>HPAs no Estuário da Lagoa dos Patos</i>	10
3.3	Uso de diferentes matrizes na avaliação da contaminação de HPAs em ambientes marinhos	12
3.4	O metabolismo de HPAs em organismos aquáticos	14
4	<i>Objetivos</i>	17
5	<i>Metodologia e estratégia empregada</i>	18
5.1	A escolha do contaminante de exposição	18
5.2	Materiais	19
5.3	A seleção da espécie	19
5.4	Amostragem e aclimação	21
5.5	Obtenção das amostras de urina	22
5.6	Efeito Matriz	24
5.7	Experimento de tempo de exposição/resposta	25
5.8	Experimentos de dose/reposta	25
5.9	Experimentos de depuração	26
5.10	Análises estatísticas	26

5.11	Análise por Fluorescência UV	27
6	Resultados	27
6.1	Adequação da espécie a metodologia.....	27
6.2	Padrão de respostas.....	29
6.3	Efeito Matriz.....	32
6.4	Experimentos de Tempo de Exposição/Resposta	34
6.5	Experimentos de Dose/Resposta	35
6.6	Experimento de Depuração	37
6.7	Análise Estatística	38
6.7.1	Experimento de tempo de exposição/resposta	38
6.7.2	Experimentos de dose/resposta	39
6.7.3	Experimentos de depuração	39
7	Discussão	39
8	Conclusões	49
9	Considerações Futuras	50
10	Referências Bibliográficas	51

1 Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most important contaminants of the coastal and marine environments. Biological monitoring can provide information about the bioavailable fraction and possible deleterious effects of PAHs on the marine biota. Thus, urine samples of blue crabs (*Callinectes sapidus* (Decapoda, Brachyura)) exposed to pyrene concentrations ranging from 0 to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were taken and analyzed by UV-fluorescence spectrophotometry. Time- and dose-response experiments demonstrate that urinary levels of pyrene metabolites (expressed as 1-OH pyrene) reached a maximum after 24h. Urinary levels confirmed their metabolic capabilities and proved to be dose-dependent ($R^2 > 0,9$). Even after 10 days, the levels of metabolites in exposed crabs were still significantly higher than in control organisms. These data pointed the potential of urine analyses by UV-fluorescence to measure exposure of crustaceans to PAHs.

2 Resumo

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão entre os principais contaminantes encontrados nos ambientes costeiros e estuarinos. O uso de amostras biológicas na avaliação de HPAs, reflete a fração efetivamente absorvida destes contaminantes e possibilita estimar possíveis efeitos deletérios causados por esta exposição. Desta forma, amostras de urina de siris (*Callinectes sapidus* (Decapoda, Brachyura)) expostos a concentrações de pireno que variaram entre 0 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram coletadas e analisadas por fluorescência UV. Experimentos visando avaliar as relações tempo de exposição/resposta, dose/resposta e capacidade de depuração demonstraram que os níveis de excreção alcançaram um máximo após 24 horas de exposição. Níveis de fluorescência (expressos em equivalentes de 1-OH pireno), comprovaram a capacidade de metabolizar pireno apresentada pela espécie, demonstrando uma forte relação entre níveis de exposição e resposta ($R^2 > 0,9$). Mesmo após 10 dias de depuração, os níveis de metabólitos de pireno demonstraram ser significativamente mais altos que aqueles encontrados em organismos mantidos como controle. Estes resultados demonstram o grande potencial apresentado pela análise da urina de *Callinectes sapidus*, analisada por fluorescência UV, como medida de avaliação da exposição de crustáceos a HPAs.

3 Introdução

3.1 Aspectos gerais

Ao longo da evolução, a tendência humana em distribuir-se em regiões costeiras e estuarinas, tem agravado as conseqüências danosas ao meio ambiente (Kennish, 1997). Uma infinidade de compostos gerados por atividades antropogênicas, lançados nestas áreas, muitas vezes acabam atingindo concentrações que alteram química, física, biológica ou esteticamente o ambiente, tornando-se assim poluentes (Fillmann, 2001). Um amplo espectro de contaminantes é responsável por estas alterações, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Clark, 1997).

O lançamento de HPAs em ambientes aquáticos ocorre principalmente pela deposição atmosférica, lançamento de esgotos (pluviais, domésticos e industriais), derrames de petróleo e derivados (Kennish, 1997). Entretanto, fontes naturais como a síntese biológica, erupções vulcânicas, queima de florestas, formação de combustíveis fósseis e a extrusão natural do solo, também geram quantidades significativas destes compostos (McElroy *et al.*, 1989).

Nas últimas décadas, tem se dado grande importância a este tipo de contaminante, principalmente pelo potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico apresentado por vários HPAs tanto a organismos marinhos como a seres humanos (Aas *et al.*, 2001; Jongeneelen, 1997; Angerer *et al.*, 1997; Kennish, 1997; Burgeot, 1996; Pandey *et al.*, 1995; Kurelec, 1993; James, 1989). A grande afinidade de HPAs por partículas faz com que as maiores concentrações deste contaminante sejam encontradas nos sedimentos próximos a fontes (Kennish, 1997). Apesar de apresentarem as mais altas concentrações, a fração associada ao sedimento nem sempre representa aquela bioassimilável pelos organismos, potencialmente causadora de danos à biota (Fent, 2003) (Fig. 1).

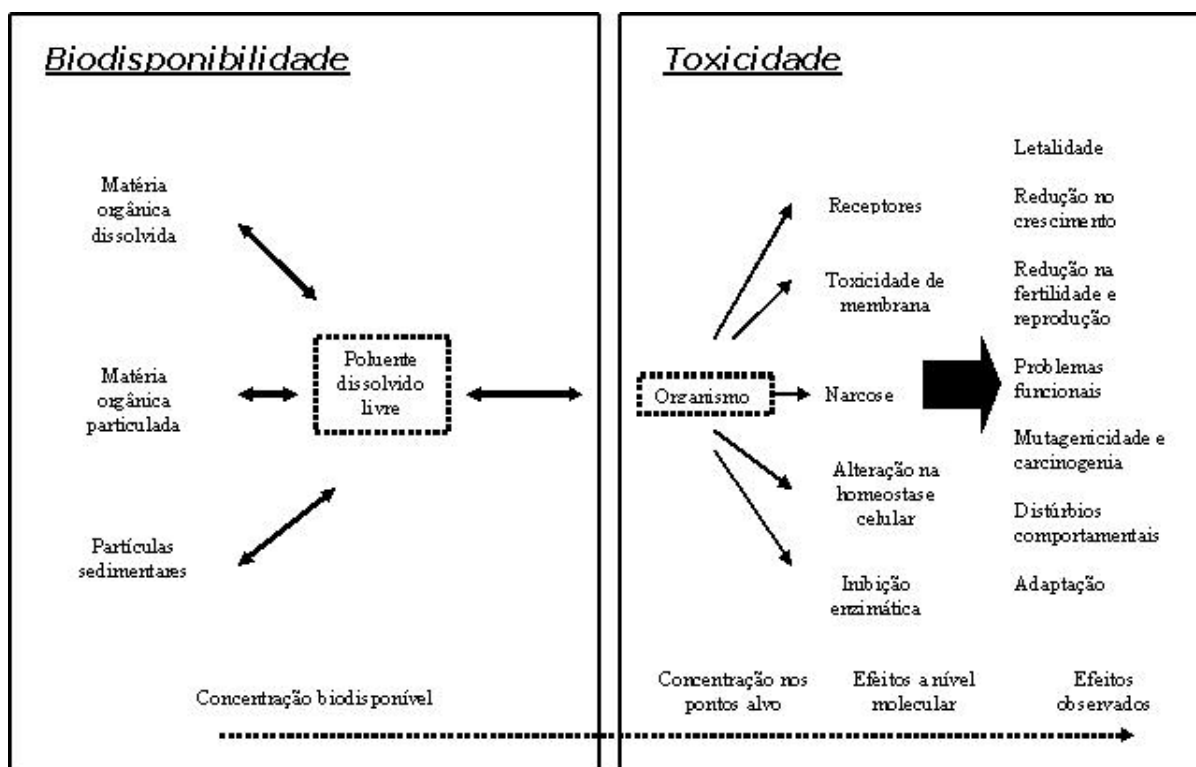


Figura 1. Cinética, biodisponibilidade e efeitos gerados pela exposição de contaminantes. Fonte: Fent, 2003.

Uma vez assimilados, os HPAs passam por diferentes processos de metabolização até serem excretados pelo organismo (Rand, 1995). Esta capacidade metabólica é inerente a um grande número de organismos marinhos que eliminam HPAs na forma de metabólitos mais facilmente excretáveis (Livingstone., 1991; Fillmann *et al.*, 2004; Fossi *et al.*, 2000; Sundt & Goksoyr, 1998; James & Boyle, 1998).

Assim como empregados na avaliação da exposição de humanos (Jongeneelen, 1997), a análise de metabólitos em amostras de urina de organismos marinhos funciona como um instrumento indicativo dos níveis e cinética dos HPAs.

Os principais métodos analíticos empregados na avaliação de metabólitos de HPAs em organismos marinhos são a Espectrofotometria de Fluorescência-UV e a Cromatografia Líquida de Alta Resolução HPLC (Aas *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2000b; Baumard *et al.*, 1997; Johnston & Baumann, 1989). Os métodos que utilizam a espectrofotometria de UV,

baseiam-se na excitação e emissão de luz, fundamentados na capacidade das moléculas de HPA absorverem a luz ultravioleta e emití-la em um comprimento de onda maior (Haugland *et al.*, 2005). A propriedade de fluorescer, isto é, apresentar um ótimo comprimento de onda de excitação, emissão e intensidade de sinal, varia amplamente entre os HPAs e é dependente do tamanho, estrutura e eventuais substituintes dentro dos compostos (Aas *et al.*, 2000b). De forma geral, o comprimento de excitação máxima aumenta com o aumento do tamanho da molécula de HPA. Desta forma, moléculas pequenas de HPAs precisam de maior energia (menores comprimentos de onda da luz excitante) que compostos maiores (Vo-Dihn, 2005).

A fluorescência UV, aplicada através de um Espectrofluorímetro UV, pode ser usada através de dois diferentes módulos de leitura, o módulo que utiliza comprimentos de onda fixos (FF) aplicando um par de ondas de excitação e emissão para cada composto testado e o módulo de espectrofotometria de fluorescência sincrônica (SFS), onde um intervalo de luz de excitação e emissão, otimizado para o tipo de HPAs a ser estudado, é utilizado (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b; Aas *et al.*, 2000b; Ariese *et al.*, 1993). Já, através dos métodos cromatográficos, são usados detectores de fluorescência (HPLC-F) determinando a presença e concentração de metabólitos de HPAs nas amostras (Fillmann *et al.*, 2004; Aas *et al.*, 2000a). As principais vantagens dos métodos de espectrofotometria UV (FF e SFS) sobre os métodos cromatográficos, são a rapidez na obtenção dos resultados e o baixo custo analítico (Fillmann *et al.*, 2004; Readman *et al.*, 2002; Yang, 2000; Aas *et al.*, 2000b). Em contrapartida, esta técnica não permite a quantificação dos níveis encontrados, o que se pode obter através da cromatografia (Haugland *et al.*, 2005).

Recentemente, o uso da Espectrofotometria de Fluorescência UV em matrizes biológicas, tem se apresentado como uma importante alternativa metodológica nos estudos de exposição a HPAs em organismos marinhos (Aas *et al.*, 2000b; Aas *et al.*, 1998), uma

vez que com o uso desta técnica se reduz de forma considerável os custos de uma caracterização ambiental.

Estudos recentes demonstraram que a análise de metabólitos de HPAs em urina de crustáceos, analisada através de Espectrofotometria de Fluorescência-UV, representa uma forma concisa de avaliação da exposição à HPAs de aplicação não destrutiva aos organismos, possibilitando inclusive a diferenciação entre locais contaminados e não contaminados (Galloway *et al.*, 2004; Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Galloway *et al.*, 2002; Fillmann *et al.*, 2002a). Entretanto, o sucesso desta avaliação, depende de fatores intrínsecos à espécie escolhida, como a importância ecológica, abundância, manuseabilidade laboratorial, capacidade metabólica, e viabilidade de obtenção de um volume mínimo de urina (>20 µL). Uma vez supridas estas exigências, devem ser comprovadas as correlações de dose/resposta e tempo de exposição/resposta para posterior validação da metodologia em campo.

3.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

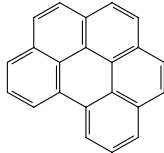
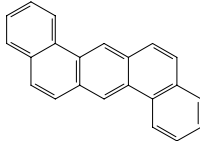
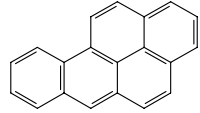
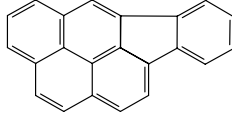
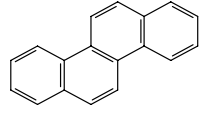
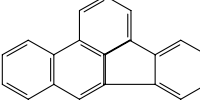
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos formados por carbono e hidrogênio, arrançados em dois ou mais anéis benzênicos lineares, angulares ou mesmo agrupados (Kennish, 1997). Dentre os HPAs, os mais encontrados no meio ambiente são compostos formados por dois (naftaleno, bifenil, acenaftaleno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, 2,6-dimetilnaftaleno), três (fluoreno, fenantreno, 1-metilfenantreno, antraceno), quatro (fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno) e cinco anéis aromáticos (benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, perileno, dibenzo(a,h)antraceno e criseno) (Kennish, 1997).

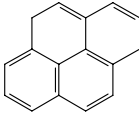
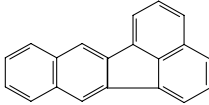
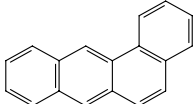
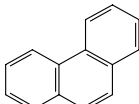
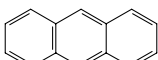
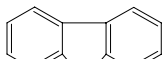
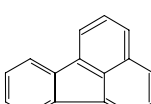
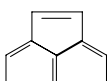
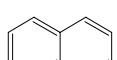
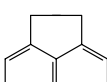
Muitos dos HPAs são considerados compostos tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, apresentando a seguinte regra geral: compostos de baixo peso molecular

formados por 2 ou 3 anéis (ex. naftaleno, fenantreno e antraceno) possuem elevada toxicidade aguda mas baixo (ou nenhum) potencial carcinogênico para grande parte dos organismos aquáticos; compostos de maior peso molecular contendo 4, 5 ou 6 anéis (ex. benzo(a)pireno, benzo(c)fenantreno) possuem baixa toxicidade aguda mas apresentam um maior potencial carcinogênico (Kennish, 1997; Clark, 1997; Witt, 1995; Rand, 1995) (Tabela 1).

A contaminação por HPAs originários de fontes petrogênicas demonstram dominância de compostos de 2-3 anéis aromáticos, enquanto o predomínio de compostos de 4-5 anéis geralmente está associado a fontes pirolíticas (Carr & Neff, 1988).

Tabela 1. Características apresentadas por alguns HPAs.

Composto	Carcinogenia	Kow	Solubilidade (µg/L)	Fórmula Molecular	Estrutura molecular	Nº Anéis
Benzo(g,h,i)perileno	-	6,78	0,3	-		6
Dibenzo(a,h)antraceno	+++	-	-	C ₂₂ H ₁₄		5
Benzo(a)pireno	+++	6,04	3,8	C ₂₀ H ₁₂		5
Indeno(1,2,3-cd)pireno	+	-	-	-		6
Criseno	-	5,63	1,9	C ₁₈ H ₁₂		4
Benzo(b)fluoranteno	++	6,21	2,4	C ₂₀ H ₁₂		5

Pireno	-	4,98	133,0	C ₁₆ H ₁₀		4
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	C ₂₀ H ₁₂		5
Benzo(a)antraceno	+	5,63	11,0	C ₁₈ H ₁₂		4
Fenantreno	-	4,46	435	C ₁₄ H ₁₀		3
Antraceno	-	4,5	59	C ₁₄ H ₁₀		3
Fluoreno	-	-	800	C ₁₃ H ₁₀		3
Fluoranteno	-	5,03	260,0	C ₁₆ H ₁₀		4
Acenaftileno	-	-	-	C ₁₂ H ₈		3
Naftaleno	-	-	-	C ₁₀ H ₈		2
Acenafteno	-	-	-	C ₁₂ H ₁₀		3

Obs.: ND = Capacidade carcinogênica não determinada, + = Baixa carcinogenicidade, ++ = De baixa a moderada carcinogenicidade, +++ = Carcinogenicidade moderada, ++++ = Alta capacidade carcinogênica. Fonte: Afghan, B. K. & Chau, A. S. Y. (Eds.), Analysis of Trace Organics in the Aquatic Environment, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, 220 em Kennish, 1997.

Tabela 2. Principais fontes de HPAs na atmosfera e ambiente aquático (Modificado de Kennish, 1997).

Ecosistema e Fontes	Carga anual (toneladas métricas)
Atmosfera	
Total de HPAs	
Incêndios em florestas e pradarias	19,513
Queima na agricultura	13,009
Queimadas locais	4769
Incineração fechada	3902
Geração de calor e força	2168
Ambiente Aquático	
Total de HPAs	
Hidrocarbonetos de Petróleo	170,000
Deposição atmosférica	50,000
Descarte de água	4400
Lavagem da superfície terrestre	2940
Biossíntese	2700

Parte dos HPAs lançados no meio marinho provém de fontes naturais podendo ser sintetizados por bactérias, plantas, fungos ou mesmo serem liberados através de produtos e processo naturais como erupções vulcânicas, queima de florestas, carvão ou mesmo de vazamentos naturais no solo oceânico (McElroy *et al.*, 1989). Por outro lado, consideráveis quantidades de HPAs lançados ao meio marinho são originárias de fontes antropogênicas (Kennish, 1997). Dentre estas fontes, as principais são os efluentes industriais, efluentes domésticos, incineração de lixo, derrames de óleo, produção de asfalto, creosoto e a queima de combustíveis fósseis (Clark, 1997). Apesar de consideráveis quantidades de HPAs serem lançados por meio de efluentes, a principal rota deste contaminante para o meio marinho é a queima de combustíveis fósseis e conseqüente transporte aéreo (Kennish, 1997)(Tabela 2).

3.2.1 Processos de transformação de HPAs no meio marinho

Transformações como fotoxidação, oxidação química e metabolismo biológico, ocorridas com os HPAs introduzidos no meio marinho, representam importantes formas de redução nas concentrações destes compostos. Características como a baixa solubilidade

(Wei & Chan, 2000) e a natureza hidrofóbica ($\log K_{ow}=3-8$) apresentados pelos HPAs favorecem a associação com partículas em suspensão e, conseqüente, sedimentação (McElroy *et al.*, 1989, Fillmann, 2001). Uma vez aderidas a partículas, posteriormente sedimentadas, os processos de fotoxidação e oxidação químicas se tornam menos efetivos (Kennish, 1997), reduzindo seu potencial de dispersão acarretando altas concentrações próximas a fontes como refinarias, esgotos domésticos, lançamentos industriais, entre outros (Medeiros *et al.*, 2005).

Fatores relacionados à dinâmica local (como correntes ou mesmo remoção por dragagem) contribuem para a redistribuição deste tipo de contaminante. Estes processos de remoção podem transferir hidrocarbonetos associados ao sedimento de volta à coluna d'água e, conseqüentemente, torná-los biodisponíveis para um grande número de espécies aquáticas. Processos de bioturbação também podem se tornar significativos na transferência de HPAs para coluna d'água (Reible *et al.*, 1996). Esta transferência ocorre principalmente em locais de baixa dinâmica ou onde alterações físicas provocadas, por exemplo, por ação de ondas e marés tem uma ação reduzida (McElroy *et al.*, 1989).

Outro fator importante relacionado à assimilação de HPAs pela biota é sua solubilidade. Apesar de serem considerados hidrofóbicos, os HPAs apresentam um amplo espectro de solubilidades (Tabela 1). Características como a temperatura e salinidade da água, pouco interferem nesta solubilidade (Witehouse, 1984; Readman *et al.*, 1982).

3.2.2 HPAs no Estuário da Lagoa dos Patos

Sistemas caracterizados pela baixa taxa de troca relativa ao seu volume como estuários e baías semi-fechadas, são extremamente suscetíveis ao lançamento de contaminantes (Kennish, 1997). A elevada importância ecológica destes ambientes juntamente com o considerável número de atividades antropogênicas ao seu redor, faz com

que estes recebam diariamente uma grande carga de compostos de relevante impacto ecológico (Clark, 1997). A grande quantidade de material em suspensão, muitas vezes presente nestas áreas funciona como sítios ativos para contaminantes como hidrocarbonetos (Volkman *et al.*, 1992).

Apesar de caracterizar-se como sendo de baixa diversidade, reflexo da alta instabilidade ambiental, um grande número de espécies depende dos estuários em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (Seeliger *et al.*, 1997).

Assim como em outras regiões estuarinas, a região do Estuário da Lagoa dos Patos (ELP) possui elevada produção primária que fornece abundância de alimento e proteção contra predadores para diversas espécies de peixes e crustáceos durante seus estágios larvais e juvenis. Desta forma, o ELP representa uma zona de berçário que permite uma elevada taxa de crescimento e baixa mortalidade das espécies ali presentes (Ibágy, 1997).

Apesar da sua grande importância ecológica (Seeliger *et al.*, 1997), o ELP sofre o aporte de diversos tipos de contaminantes, dentre os quais se destacam os HPAs (Medeiros *et al.*, 2005; Fillmann *et al.*, 2002b). Níveis elevados de HPAs totais tem sido observados próximos aos efluentes da Refinaria Ipiranga, Distribuidora de Combustíveis e a área do Porto Novo (4430, 11780 e 8780 ng.g⁻¹ respectivamente) (Medeiros *et al.*, 2005).

A importância ecológica associada ao potencial de contaminação local faz com que o ELP se apresente como um ambiente adequado para o estudo e elaboração de novas metodologias que visem à avaliação do impacto causado por HPAs, através do uso de amostras de metabólitos ou tecidos obtidos da biota local. A presença de espécies de crustáceos representativas e abundantemente encontradas em diversas áreas do estuário, também contribui para o desenvolvimento destas metodologias.

3.3 Uso de diferentes matrizes na avaliação da contaminação de HPAs em ambientes marinhos

A contaminação ambiental por HPAs têm sido foco de estudos ao redor de todo mundo. Diferentes metodologias têm sido aplicadas na determinação das concentrações destes contaminantes, principalmente através de compartimentos como água e sedimento (Medeiros *et al.*, 2005; Readman *et al.*, 2002; Zanardi *et al.*, 1999; Baumard *et al.*, 1998b; Al-Lihaibi & Ghazi, 1997; Law *et al.*, 1997; Guzzella & DePaolis, 1994; Volkman *et al.*, 1992; Lipiatou & Saliot, 1991; Kayal & Connell, 1989; Barrick & Prahl, 1987; LaFlamme & Hites, 1978). O uso de matrizes biológicas, diferentemente de amostras de água e sedimento, tem como principais vantagens fornecer uma avaliação integrada de todas as vias de exposição e conseqüente bioassimilação. A concentração de HPAs em amostras biológicas está associada a três fatores principais: a variação da concentração destes compostos no ambiente; os diferentes graus de bioassimilação de cada composto e a capacidade de metabolização destes pelos diferentes grupos de organismos (Kennish, 1997).

Um grande número de trabalhos, utiliza métodos cromatográficos para determinação dos níveis de HPAs em tecidos biológicos como por exemplo: partes moles de moluscos (Baumard *et al.*, 1997; Burt & Ebell, 1995), músculo de peixes e tecidos moles de crustáceos (Kayal & Connell, 1995) e bile de peixes (Porte & Escartin, 2000; Johnston & Baumann, 1989; Krahn *et al.*, 1982). Entretanto, nos últimos anos, a espectrofotometria de fluorescência UV tem sido aplicada como alternativa para determinar a presença de HPAs biodisponíveis no meio marinho. Através deste método, já forma analisadas amostras de bile de peixes (Jonsson *et al.*, 2004; Aas *et al.*, 2000b; Aas & Klungsoyr, 1998; Aas *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 1998; Ariese *et al.*, 1993), urina e hemolinfa de crustáceos (Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et*

al., 2004b; Galloway *et al.*, 2002; Fillmann *et al.*, 2002a). A espectrofotometria de fluorescência-UV, aplicada tanto no módulo de FF como no SFS, não possui a capacidade de identificar os metabólitos individuais de HPAs formados pelos organismos, por isso é considerada uma técnica semi-quantitativa e semi-qualitativa (Haugland *et al.*, 2005). Apesar disso, esta técnica é capaz de discriminar, entre locais impactados e não impactados por HPAs através das concentrações relativas de compostos de diferentes números de anéis aromáticos (Jonsson *et al.*, 2004).

Com relação a aplicação dos módulos da espectrofotometria UV; um estudo na costa da Inglaterra, demonstrou que a aplicação do módulo FF em amostras de urina de crustáceos apresentou, de uma forma mais clara, as diferenças entre locais contaminados e não contaminados por HPAs (Dissanayake & Galloway, 2004). Além disso, o uso do módulo FF reduz o tempo de leitura possibilitando o processamento de um maior número de amostras em um menor intervalo de tempo.

O uso de FF limita a banda de excitação na qual a amostra é submetida, desta forma o usuário deve selecionar o comprimento de onda de excitação/emissão utilizado, de acordo com o composto ou grupo de compostos a serem analisados. Esses valores são conhecidos como pares de excitação/emissão. Vários autores têm descrito diferentes pares de comprimentos de onda para detecção de metabólitos de pireno em amostras de bile de peixes incluindo (341/383 nm (Aas *et al.*, 1998; Beyer *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 1998), 345/395 nm (Escartin & Porte, 1999; Ariese *et al.*, 1993) e 349/391 nm (Sundt & Goksoyr, 1998). Para amostras de urina de caranguejos, os pares de comprimentos 345/382 nm foram considerados como ideais para a detecção destes metabólitos (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Fillmann *et al.*, 2002a).

O uso de órgãos ou tecidos em análises que utilizam fluorescência-UV, apesar de apresentarem bons resultados, não escapam da necessidade de um prévio tratamento

eliminando interferentes analíticos. Este tipo de tratamento, onde a amostra sofre previamente uma extração, é dispensado quando trabalhamos com amostras de urina ou hemolinfa (Galloway *et al.*, 2002). Nestas matrizes, previamente filtradas, grande parte dos interferentes analíticos são eliminados durante a própria formação da urina, em um processo de ultra filtração, que tende a concentrar os HPAs, facilitando sua análise instrumental. Recentemente, esta técnica foi aplicada com sucesso na costa da Inglaterra (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Fillmann *et al.*, 2002a) e Noruega (Dissanayake & Galloway, 2004).

3.4 O metabolismo de HPAs em organismos aquáticos

Como o número de compostos lançados de forma natural ou antropogênica é muito grande, mecanismos de defesa para uma grande variedade de moléculas foram desenvolvidos em diversos grupos de organismos. Dentre estes mecanismos, o sistema enzimático P-450, dependente das Oxigenases de Função Mista (MFO), é um dos principais responsáveis pela metabolização, ativação e inativação de químicos exógenos e endógenos, sendo alguns deles tóxicos e outros importantes reguladores moleculares como por exemplo os esteróis (Stegeman & Livingstone, 1998). O uso de amostras de urina de organismos, inclusive humanos, como indicadores da presença de HPAs só é possível devido a ação do sistema P-450, que possibilita a metabolização e eliminação dos contaminantes assimilados.

O principal método de ação das enzimas do citocromo P-450 é a introdução de um grupo funcional a um composto aumentando a sua solubilidade e, conseqüentemente, o tornando mais facilmente excretável. Para isso são descritas duas principais fases, a Fase I também chamada Reações de Funcionalização e Fase II ou Reações de Conjugação (Fig. 2) (Livingstone, 1991). Na Fase I um grande número de enzimas catalisa praticamente

qualquer reação química que o composto possa sofrer, como oxidação, redução, hidrólise, hidratação entre outras. Isto sugere que a principal função desta primeira etapa não é a detoxificação nem mesmo o aumento da solubilidade destes compostos em água, mas sim a indução de grupos reativos funcionais como -OH, -NH₂, -SH, -COOH etc. na molécula do xenobiótico, preparando-a para a conjugação em uma variedade de compostos solúveis em água que acontecem na Fase II do metabolismo (Livingstone, 1991). Desta forma, a Fase II do metabolismo é aquela que realmente representa o principal caminho de detoxificação, aumentando a solubilidade do xenobiótico. A maioria das reações da Fase II requerem intermediários ricos em energia ou “ativados” na forma de um co-fator ativado ou um xenobiótico ativado (Livingstone, 1991). Entretanto, em alguns casos, a conjugação não enzimática pode ocorrer, como por exemplo na formação de N-glucorinados e glutathione conjugados ou mesmo a conjugação ser feita diretamente a partir do xenobiótico original, sem precisar da Fase I do metabolismo (Livingstone, 1991; Livingstone, 1998).

Entretanto durante o curso de algumas reações, principalmente na Fase I de biotransformação, intermediários formados podem apresentar maior toxicidade, mutagenia e carcinogenia que compostos iniciais. Um bom exemplo destes compostos são alguns hidrocarbonetos poliaromáticos (Livingstone, 1991).

É comum a associação entre detoxificação biológica e aporte de contaminantes lançados por atividade humana (Rand, 1995). Entretanto, a capacidade de metabolização de compostos orgânicos presente em organismos está associada a processos evolutivos relacionados a mecanismos de defesa. Desta forma, diversos compostos naturais também passam por processos metabólicos de detoxificação, importantes seleção natural de espécies (Livingstone, 1991).

A metabolização de HPAs está presente em diferentes grupos de organismos marinhos, variando desde bactérias e fungos até organismos superiores como mamíferos

aquáticos (Kennish, 1997). Um bom exemplo desta capacidade pode ser observado em locais que sofreram derrames de petróleo. A comunidade bacteriana nestes locais alcança altas densidades, aumentando a taxa de degradação de hidrocarbonetos lançados no meio (Kennish, 1997). Nestes casos, fatores como a presença de sedimentos aeróbicos, temperaturas elevadas e a disponibilidade de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, aceleram os processos e facilitam a ação bacteriana (CETESB, 2002; DeLaune *et al.*, 1980).

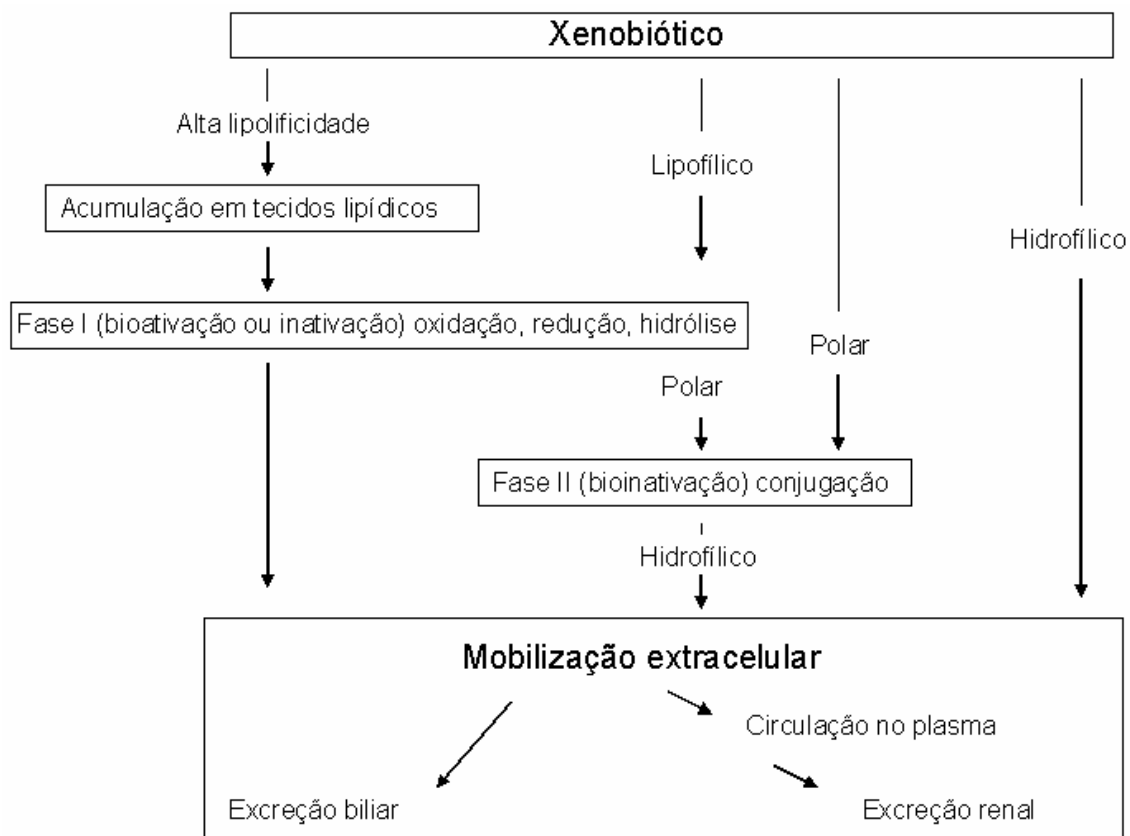


Figura 2. Rota de excreção apresentada por xenobióticos naturais e poluentes em organismos marinhos. Fonte: Modificado de Livingstone, 1991.

Conhecer as similaridades e diferenças relacionadas a biotransformação de contaminantes são processos fundamentais para elaborar os diferentes testes de toxicidade, desenvolver técnicas de biomarcadores, modelar o comportamento de contaminantes no

meio ambiente e entender a seletividade na biotransformação animal a suas implicações ecológicas e evolutivas (Livingstone, 1991; Livingstone, 1998).

Um grande número de estudos relacionam a exposição de xenobióticos e a identificação de metabólitos gerados por processos metabólicos, entre eles se destacam em número, os HPAs. Diversos trabalhos identificaram metabólitos primários e conjugados de HPAs em bile e urina de vertebrados e invertebrados marinhos (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b; Aas *et al.*, 1998; Ariese *et al.*, 1993; James *et al.*, 1988; Solbakken *et al.*, 1980). Dentre estes, os crustáceos apresentam uma ampla capacidade de metabolizar HPAs associada ao sistema enzimático P-450 (James & Boyle, 1998). Apesar do hepatopâncreas ser o principal órgão de metabolização de HPAs em crustáceos, tecidos como brânquias, estômago, intestino e glândula antenal apresentam uma considerável atividade relacionada ao P-450, demonstrando sua relevância toxicológica para certos xenobióticos, dependendo da rota de exposição (James & Boyle, 1998).

4 Objetivos

Visando o desenvolvimento de uma técnica que possibilitaria a avaliação da exposição à HPAs em zonas estuarinas através de amostras de urina de crustáceos, o presente estudo teve como objetivos específicos:

- Selecionar uma espécie de crustáceo representativa do Estuário da Lagoa dos Patos para ser testada como organismo indicador de exposição à HPAs;
- Adaptar a técnica de obtenção de amostras de urina desenvolvida por Bamber & Naylor (1997) para a espécie selecionada, incluindo as metodologias de manuseio, depuração/aclimatação, obtenção da urina e exposição em condições controladas de laboratório;

- Avaliar o efeito matriz apresentado pela urina da espécie selecionada, estabelecendo os níveis de diluição ideais para o uso da técnica;
- Estabelecer as relações de tempo de exposição/resposta e dose/resposta apresentada pela espécie selecionada através de experimentos de exposição a diferentes concentrações de pireno por períodos de até 10 dias.

5 Metodologia e estratégia empregada

5.1 A escolha do contaminante de exposição

O pireno constitui um dos principais contaminantes (1-10%) da classe dos HPAs encontrados no meio marinho (Kennish, 1997). Sua presença pode ser usada como medida indireta dos níveis de contaminação por HPAs (Jongeneelen, 2001). A origem ambiental deste composto está associada a fontes petrogênicas e principalmente pirolíticas. Um dos principais metabólitos gerados pela exposição ao pireno, o 1-OH pireno, tem sido amplamente indicado como um biomarcador de exposição humana a HPAs através de amostras de urina (Jongeneelen, 2001; Levin *et al.*, 1995). Em estudos ambientais, o uso dos metabólitos de pireno como indicador de exposição a HPAs também tem sido vastamente aplicado em amostras de bile de peixes (Ruddock *et al.*, 2003; Ruddock *et al.*, 2002; Leonard & Hellou, 2001; Beyer *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1994; Ariese *et al.*, 1993), urina e hemolinfa de crustáceos (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Galloway *et al.*, 2002; Fillmann *et al.*, 2002a). No caso de amostras de bile de peixes, os conjugados de 1-OH pireno apresentam-se como principais metabólitos encontrados em diferentes espécies expostas a sedimentos contaminados por HPAs (Ruddock *et al.*, 2002; Ariese *et al.*, 1993). Em amostras de urina de crustáceos, compostos

conjugados, formados na Fase II do metabolismo, representam a maior fração dos metabólitos gerados a partir da exposição ao pireno (Fillmann *et al.*, 2004).

O uso do 1-OH pireno e seus conjugados, analisados em amostras de urina de crustáceos, tem apresentado bons resultados em experimentos laboratoriais e em situações em campo, demonstrando ser uma ferramenta concisa para determinar a presença desta classe de contaminantes no meio marinho (Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004b).

5.2 Materiais

Para este estudo, foram usados pireno (99%, cat.n°18551-5) e 1-OH pireno (98%, cat.n°36,151-8) da Sigma-Aldrich, adquiridos da empresa Hellma Sulamericana (SP, Brasil). Etanol grau cromatográfico (JT Baker) foi adquirido da Hexis Científica (Jundiaí, SP, Brasil) e acetona PA (Merck) da Pró Análise (Porto Alegre, Brasil).

5.3 A seleção da espécie

Duas espécies de crustáceos, abundantemente encontrados no Estuário da Lagoa dos Patos, foram previamente selecionadas para a execução deste trabalho: *Chasmagnatus granulatus* e *Callinectes sapidus*. Esta escolha foi baseada em quatro fatores principais:

1. Importância ecológica, abundância e presença da espécie escolhida durante o ano todo (não dependendo, desta forma, do fator sazonalidade em futuras amostragens de campo);
2. A facilidade na obtenção e manuseio desta espécie em laboratório;
3. A viabilidade de coleta de um volume considerável de urina a ser usado nas análises de espectrofotometria de fluorescência UV (mínimo de 20µL);

Inicialmente, a espécie selecionada foi *Chasmagnathus granulatus*. A seleção desta espécie baseava-se na facilidade de obtenção do organismo, baixa mobilidade indicando representatividade local e fácil manutenção em laboratório. Durante os seis primeiros meses de trabalho, buscou-se adaptar a metodologia de obtenção de amostras de urina descrita por Bamber & Naylor (1997) para esta espécie. Entretanto, as amostragens indicavam que para obtenção de um volume mínimo de 20µL (mínimo utilizado nas análises), eram necessários organismos com um tamanho médio acima do encontrado comumente em diversas regiões do estuário. A média de urina obtida era de apenas 10µL e a obtenção destas amostras era dificultada pelo tamanho do nefroporo desta espécie. Desta forma, o Siri Azul (*Callinectes sapidus* (Decápoda: Brachyura) passou a ser a espécie alvo para o estudo (Fig. 3).



Figura 3. *Callinectes sapidus*, a espécie selecionada para o estudo.

Apesar da agressividade característica da espécie e a dificuldade na aclimação, o siri azul supria todas as necessidades para a realização dos testes. Outras vantagens envolviam a espécie, como a sua ampla distribuição geográfica, que facilitaria a aplicação da técnica em diversos locais, o grande número de organismos em estágio adulto encontrados no estuário e, ainda, um considerável número de estudos envolvendo contaminantes orgânicos e a espécie (Mothershead & Hale, 1992; Lee, 1989; Moese & O'Connor, 1985; Pearson *et al.*, 1981; Sherry, 1975). A principal desvantagem demonstrada pela espécie escolhida seria a grande capacidade de deslocamento, o que dificultaria a futura aplicação da técnica em condições reais de campo.

5.4 Amostragem e aclimação

A aclimação teve por objetivo a depuração dos eventuais contaminantes contidos nos organismos coletados em campo e a adaptação destes às condições experimentais de laboratório. Todos organismos usados nos testes estáticos foram capturados próximo a Ilha dos Marinheiros por pescadores locais (Fig. 4). Apesar de não existirem estudos sobre a contaminação por HPAs nesta área do estuário, esta região encontra-se distante de fontes relevantes de contaminação e apresenta grande abundância da espécie escolhida.

Somente machos adultos com comprimento total de carapaça (CT) superior a 11cm e em estágios intermodais foram selecionados, mantidos em caixas plásticas imediatamente levados até o Laboratório de Crustáceos Decápodes da FURG para aclimação.

Uma vez no laboratório, os organismos foram distribuídos em tanques recobertos com 10cm de sedimento (areia fina) contendo cerca de 90 litros de água salgada (S=15), a uma densidade não superior a 10 organismos por tanque. Durante o período de aclimação (de 5 a 7 dias), seguindo o período usado por (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Fillmann *et al.*, 2002a), os organismos foram mantidos a uma

temperatura controlada de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Foi fornecida alimentação diária *ad libitum* a base de camarões. Este alimento era mantido por cerca de 5 horas nos tanques sendo, posteriormente, retirando os restos alimentares e trocando cerca de 50% do seu volume total de água, para evitar a queda na qualidade da água por aumento nas concentrações de compostos nitrogenados. A alimentação era interrompida 48 horas antes do início dos experimentos.

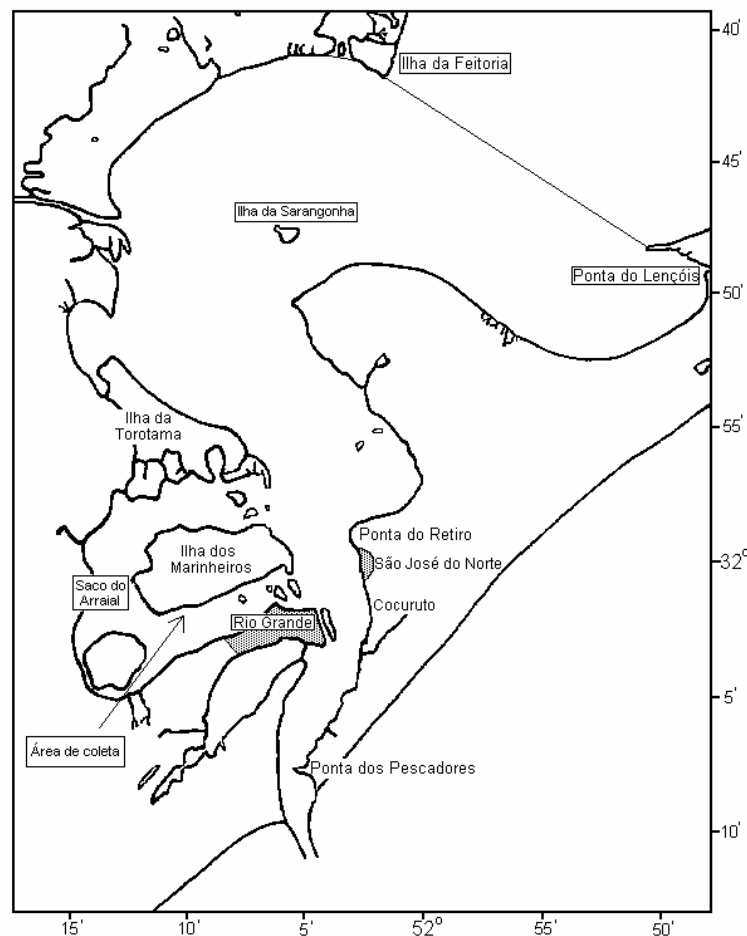


Figura 4. Área de coleta dos organismos.

5.5 Obtenção das amostras de urina

Recentemente, têm se desenvolvido técnicas que utilizam amostras de urina de crustáceos na determinação da presença ou não de HPAs no ambiente (Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b;

Fillmann *et al.*, 2002a). Nestes estudos, três espécies foram usadas: *Carcinus maenas* (Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004a; Watson *et al.*, 2004b; Fillmann *et al.*, 2002a), *Ucides cordatus* (Santos, 2002) e *Cancer magister* (Eickhoff & Law, 1995). Dentre as metodologias usadas nestes trabalhos, aquela descrita para a espécie *Cancer magister* (Eickhoff & Law, 1995) diferencia-se das demais por apresentar a adaptação de um receptáculo colado à carapaça do animal, onde a urina excretada é armazenada e posteriormente coletada para análise. Nos outros estudos a obtenção da urina baseia-se na técnica desenvolvida por Bamber e Naylor (1997). Para o presente estudo, esta metodologia foi adaptada à espécie *Callinectes sapidus*. Individualmente, os organismos eram retirados dos aquários contendo as diferentes concentrações de pireno e transferidos para uma bandeja contendo papel absorvente para secagem, onde eram colocadas “luvas” em cada uma das quelas. Em seguida, os organismos eram fixados em uma pequena tábua de madeira e presos com elásticos de forma a facilitar o manuseio, evitar danos aos organismos e manter o corpo destes verticalizado facilitando a amostragem. Diferente da amostragem feita para *Carcinus maenas*, a abertura dos maxilípedes não é necessária para a exposição dos nefroporos, que se encontram expostos em *C. sapidus*. Uma vez fixados na tábua de madeira, foi retirado com papel absorvente o excesso de água próximo aos nefroporos, evitando a contaminação da amostra com água proveniente da câmara branquial ou mesmo de cavidades próximas. Posteriormente, os siris foram transferidos para um microscópio de dissecação (aumento de 10X) onde o opérculo de cada glândula antenal foi cuidadosamente aberto com o auxílio de uma agulha histológica, provocando a extrusão natural da urina (Fig. 5). A urina (40-600µL) foi coletada com um pipetador de volume variável (VOLAC® 10-1000µL), sendo transferida para tubos plásticos identificados e congelados a -20°C para posterior análise.

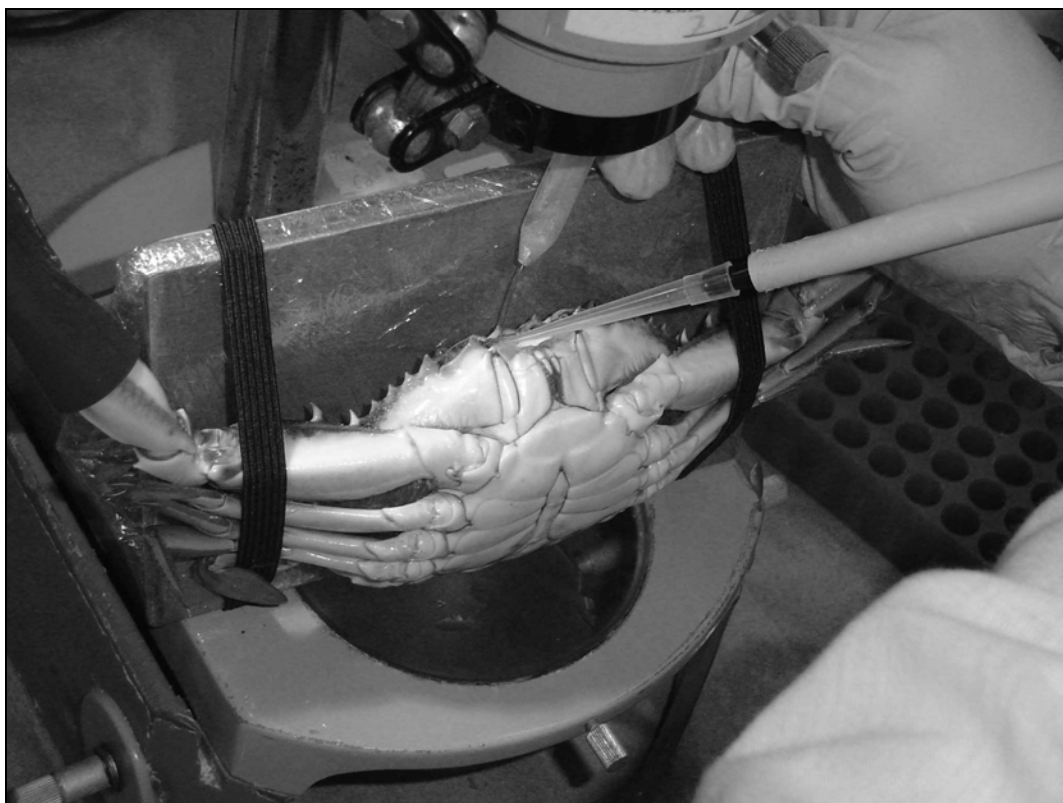


Figura 5. Procedimento de amostragem de urina.

5.6 Efeito Matriz

Apesar da urina apresentar-se como um fluido pré-filtrado e relativamente livre de interferentes, os compostos residuais constituintes da sua matriz podem interferir nas análises por fluorescência-UV (efeito matriz), inibindo ou mesmo aumentando a emissão de luz em um determinado comprimento de onda. Visando determinar a taxa de diluição ideal para as amostras e verificar a influência da matriz nesta taxa de diluição, amostras de urina obtidas de organismos controle foram adicionadas com 1-OH pireno atingindo concentrações finais de 200, 100, 50, 25, 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estas amostras foram diluídas (5 a 100 vezes) com a mistura etanol/água Milli-Q (1:1) e analisadas por espectrofotometria de fluorescência UV no módulo de comprimento fixo FF. Após esta etapa, foi selecionado o menor fator de diluição que eliminaria a interferência da matriz. Este fator de diluição foi aplicado a amostras de urina fortificadas com 1-OH pireno. A ausência de efeito matriz foi

testada através do paralelismo entre as amostras fortificadas e padrões de 1-OH pireno.

5.7 Experimento de tempo de exposição/resposta

O principal objetivo deste experimento foi determinar qual o período máximo de excreção de metabólitos após a exposição inicial a diferentes concentrações de pireno, adicionado nos aquários utilizando acetona como carreador (200, 100, 50, 25, 10 e 0 (controle) $\mu\text{g.L}^{-1}$). Seis grupos (um para cada concentração de exposição) de 5 organismos previamente aclimatados, pesados e medidos (CT), foram mantidos individualmente em aquários contendo 5 litros de água salgada ($S=15\pm 1$, $T=20^\circ\text{C}$), pré-filtrada ($5\mu\text{m}$). Amostras de urina foram coletadas (conforme descrito no item 5.4) antes (0 horas) e após (12, 24, 48, 72 e 96 horas) a exposição inicial ao pireno. Os organismos não foram alimentados durante o experimento.

5.8 Experimentos de dose/resposta

O principal objetivo destes experimentos foi avaliar a existência da relação entre as concentrações de exposição e os níveis de fluorescência efetivamente medidos na urina (dose/resposta).

Uma vez determinado o período de excreção máxima, novos organismos aclimatados e mantidos nas mesmas condições experimentais descritas acima foram usados para os experimentos de dose/resposta, executados em duplicata. Cinco organismos em cada tratamento (200, 100, 50, 25, 10 e 0 (controle) $\mu\text{g.L}^{-1}$) foram amostrados nos períodos de 0, 12, 24 e 48 horas após exposição inicial ao pireno. Estes períodos foram selecionados com base nos resultados do experimento anterior (experimento de Tempo de Exposição/Resposta) e representam os intervalos de tempo onde foram encontrados valores

máximos de fluorescência em amostras de organismos expostos ao pireno. Os organismos não receberam alimentação durante o experimento.

5.9 Experimentos de depuração

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a cinética de excreção em um período maior de tempo, os níveis dos metabólitos de pireno na urina foram quantificados em dois experimentos de 10 dias de duração. Assim como nos experimentos anteriores, 4 grupos de 5 organismos previamente pesados, medidos e aclimatados foram individualizados em aquários contendo 5 litros de água ($S=15\pm 1$, $T=20^{\circ}\text{C}$) e expostos a concentrações de 200, 100 e 0 (controle com e sem acetona) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pireno. Amostras de urina foram coletadas a cada 2 dias até um período final de 10 dias após a exposição inicial. Os organismos foram alimentados durante os testes e, para evitar a elevação dos níveis de compostos nitrogenados e promover a remoção dos metabólitos de pireno excretados, a totalidade da água dos aquários foi renovada após quatro, seis e oito dias.

5.10 Análises estatísticas

Com o objetivo de melhor analisar as diferenças entre os diversos tratamentos e tempos de exposição testados, análises estatísticas foram aplicadas aos diferentes testes. Para os testes de Tempo de exposição/resposta e Depuração, onde existem três variáveis (resposta/tempo/tratamento) foi aplicada uma análise de Anova Fatorial seguida de um teste de Student Newman-Keuls ($\alpha=0,05$). Para os testes de Dose/resposta, onde os tempos de amostragem foram tratados de forma separada e existem apenas duas variáveis (resposta/exposição) foi aplicada uma análise tipo Anova de 1 Via seguida de um teste de Student Newman-Keuls ($\alpha=0,05$). Antes de serem aplicadas as análises estatísticas, todos

dados passaram por transformações logarítmicas para obtenção da sua normalidade (Log_{10} (Log_{10} (Equivalentes de 1-OH pireno) +10)).

5.11 Análise por Fluorescência UV

Alíquotas de 50 μ L de amostras de urina, previamente descongeladas, foram diluídas (30 X) em uma mistura de etanol/H₂O MiliQ (1:1). Após esta diluição, 1,5 mL de amostras e 2 mL de padrões de 1-OH pireno (0, 5, 10, 25, 50,75, 100 e 200 μ g.L⁻¹) foram colocados em uma cubeta de quartzo de 3,5 mL, e lidas através de um Espectrofluorímetro UV modelo Hitachi 4500 no Laboratório de Química Orgânica da UFRGS. O módulo de comprimento de onda fixo (FF) foi usado para as leituras utilizando o par de excitação/emissão 345/382 nm em um intervalo de 2,5 nm, indicados para amostras contendo metabólitos de pireno, composto representativo do grupo de HPAs (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b). Soluções de 1-OH pireno foram utilizadas posteriormente para construção de uma curva analítica usada no cálculo de equivalentes de 1-OH pireno.

6 Resultados

6.1 Adequação da espécie a metodologia

Inicialmente, os organismos usados nos testes foram capturados usando armadilhas fixas. Apesar de representar a forma ideal de captura, por reduzir o estresse animal, necessita de uma grande quantidade de artefatos e um longo período para captura de um número grande de organismos. Esta limitação exigiu a busca por uma técnica de captura alternativa mais eficiente. Os exemplares foram então, adquiridos diretamente de pescadores locais, que utilizam como principal técnica de captura o arraste de portas. Neste

método, as redes são arrastadas no fundo por um longo período de tempo, causando um grande estresse, que poderia influenciar na saúde dos organismos. Para minimizar o estresse de captura, foi reduzido o tempo de arrasto de cerca de 20 minutos para 5 minutos em cada arrasto.

O comportamento de canibalismo, muitas vezes citado na bibliografia como responsável pela redução na sobrevivência (Guerin & Stickle, 1997; Hines *et al.*, 1987; Wescott, 1984), não foi observado durante o período de aclimação, possivelmente pela abundância diária de alimento. Em função da limitação de água não foi possível manter os organismos nas condições ideais de manutenção, com a renovação contínua da água (Wescott, 1984). Alternativamente, foram feitas renovações diárias da água (50% do volume total) e a instalação de um filtro biológico em cada um dos tanques. Estas modificações visavam manter a qualidade de água e evitar as altas concentrações de compostos nitrogenados como NO^{-2} , NO^{-3} , NH^{+} formados nos tanques.

Uma outra adaptação foi o recobrimento do fundo dos tanques com uma camada de 10 cm de sedimento (areia fina), obtida das dunas da Praia do Cassino (Rio Grande, RS), que permitiu o enterramento dos organismos. Este comportamento é comumente observado na espécie *C. sapidus* no meio ambiente. Após esta adaptação, foi notada uma redução na movimentação dos organismos dentro do tanque, o que pode ter contribuído com a redução do estresse sofrido durante a aclimação.

Todo conjunto de ações previamente citadas (mudanças na técnica de captura, trocas de água diárias, adaptação de filtros, alimentação diária e recobrimento do fundo com sedimentos arenosos), resultou em um considerável aumento na sobrevivência dos organismos. Antes destas adaptações eram perdidos mais de 80% dos organismos desde a coleta até o final dos experimentos, enquanto que a taxa de mortalidade foi reduzida a menos de 30% após estas modificações.

Todas estas alterações demandaram um longo período de tempo, entretanto, foram essenciais para a manutenção dos organismos em condições mais próximas daquelas consideradas ideais para a espécie.

6.2 Padrão de respostas

Assim como observado por Fillmann (2002a) e Watson (2004b), as análises de amostras de urina por fluorescência-UV no módulo FF, tanto para os experimentos de dose/resposta quanto para o experimento de tempo de exposição/resposta, produziram três picos distintos. O primeiro pico está relacionado à emissão de energia da molécula excitada pela luz UV e os seguintes são o reflexo desta resposta (Fig. 6). Em 88,2% das amostras de urina obtidas de organismos expostos ao pireno, o pico principal da emissão ocorreu no intervalo entre 379,4 e 380,4 nm, enquanto que o pico predominante do padrão 1-OH pireno foi encontrado no intervalo entre 385,2 e 386,2 nm em 92,1% das soluções do padrão (Fig. 7). Esta diferença de aproximadamente 6 nm é resultado da emissão diferencial dos compostos conjugados de pireno presentes na urina (Watson *et al.*, 2004b; Fillmann *et al.*, 2002a).

Com o objetivo de padronizar as respostas obtidas e facilitar as análises estatísticas posteriores, foram selecionados apenas os valores máximos de emissão tanto das amostras como padrões, representados pela área do primeiro pico do espectro. A partir do valor máximo de fluorescência, foi delimitado o intervalo de 10 nm (5nm para cada lado da curva a partir do pico máximo de emissão), que compreenderia a totalidade do primeiro pico (Fig. 8). A partir da integração desta curva obtivemos sua área que foi considerada como a resposta obtida pelo organismo em um determinado tratamento e tempo de exposição. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de 1-OH pireno ($\mu\text{g.L}^{-1}$) calculados através de equações de regressões lineares obtidas a partir de padrões de 1-OH

pireno com concentrações variando de 0 a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Todas as retas usadas apresentaram coeficientes de regressão (R^2) superiores a 0,99.

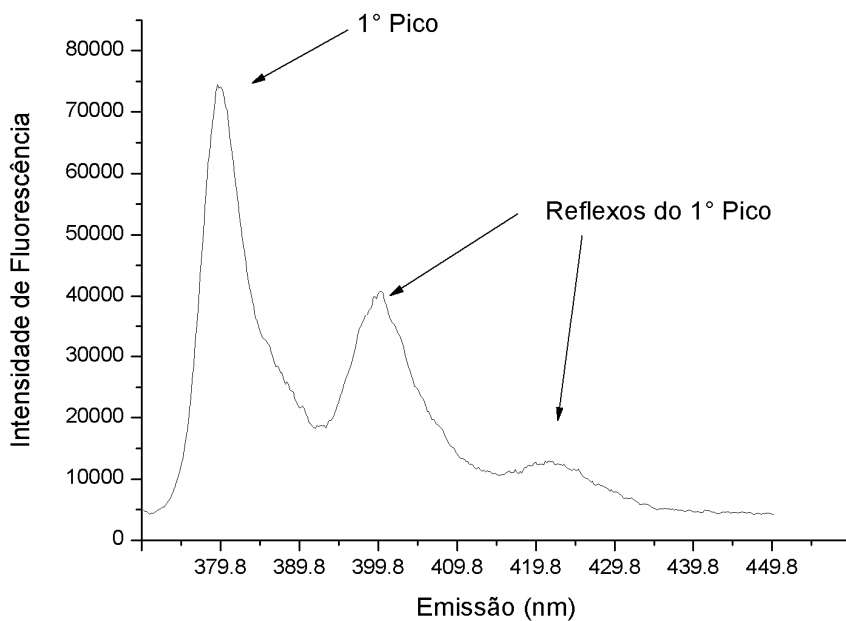


Figura 6. Padrão de resposta obtido pela leitura das amostras de urina.

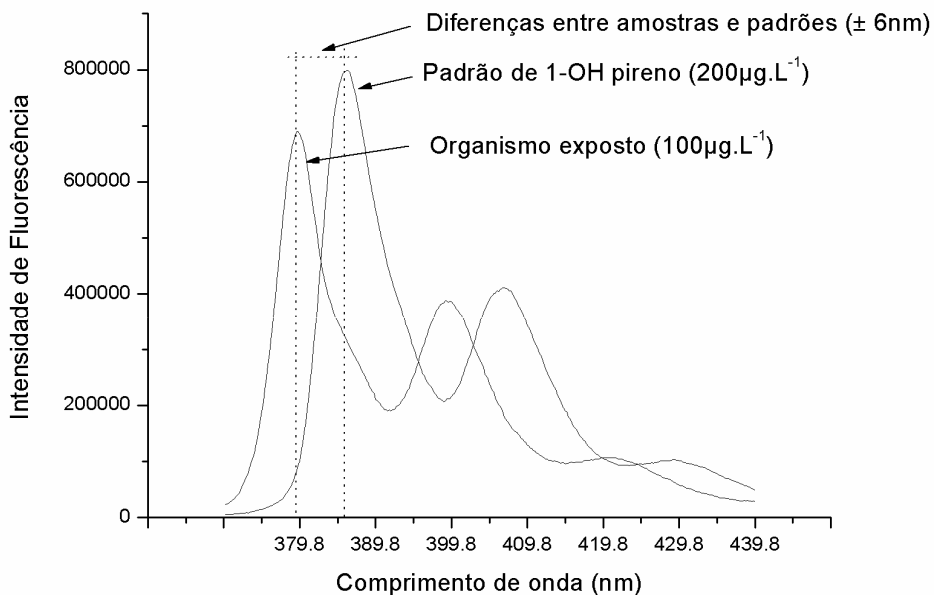


Figura 7. Padrão de resposta obtido pela leitura das amostras de urina e padrões de 1-OH pireno.

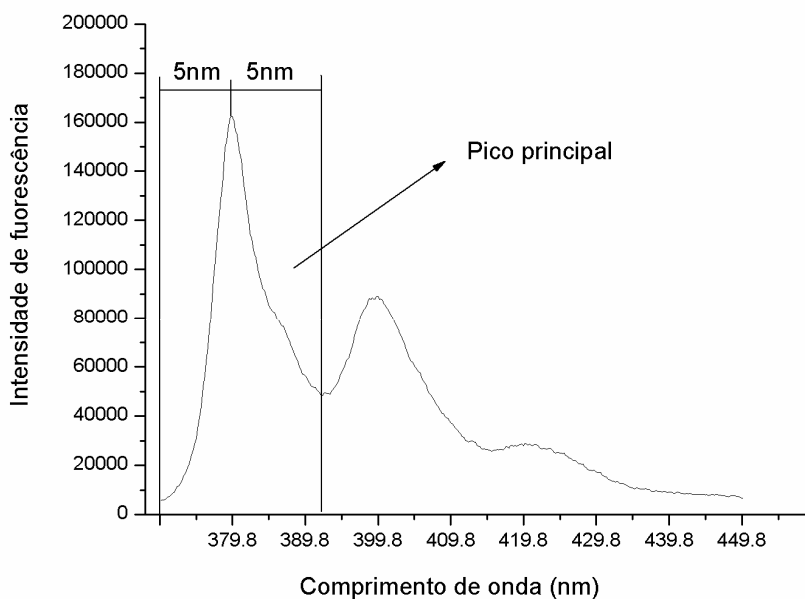


Figura 8. Delimitação dos picos utilizados na quantificação.

As amostras obtidas dos organismos mantidos como controle demonstraram ausência de picos bem definidos e fluorescência irrelevante, quando comparada aos tratamentos (Fig. 9). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na fluorescência da urina dos organismos mantidos como controle com acetona e sem acetona (Teste *t*; $p > 0,05$), nem entre amostras dos controles ao longo de cada experimento (Teste *t*; $p > 0,05$).

Outra característica notada nas amostras de urina é a ausência de picos representativos do composto pireno, representados por picos com cerca de 10nm antes daqueles característicos do composto 1-OH pireno ($\pm 375\text{nm}$) (Watson *et al.*, 2004b), indicando a total transformação do composto pireno em metabólitos excretados pela urina.

O limite de detecção da técnica ($3,15 \pm 2,85\mu\text{g.L}^{-1}$ equivalentes de 1-OH pireno) foi definido pela média dos brancos (amostras de urina obtidas antes do início dos testes) ± 3 vezes o seu desvio padrão (SD).

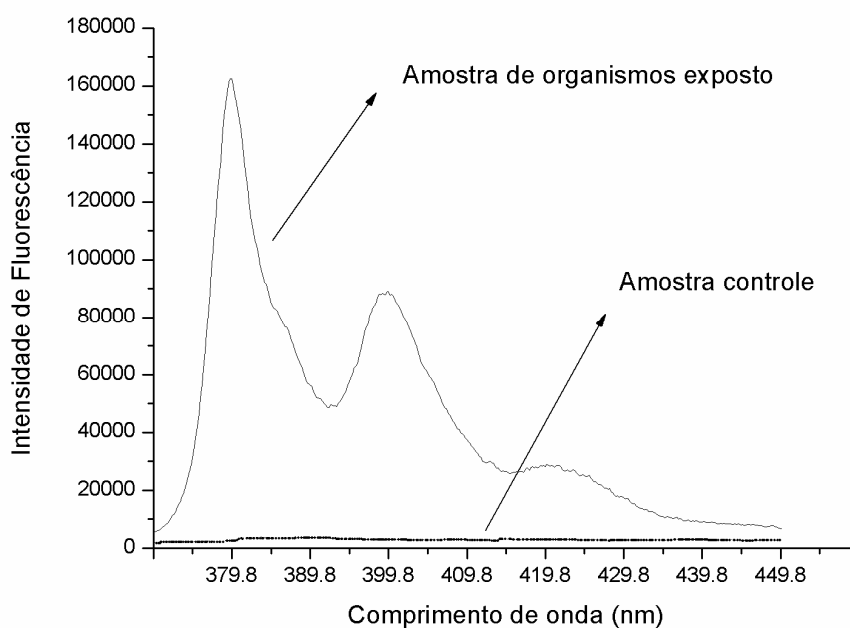


Figura 9. Padrão de resposta para amostras de urina de organismos controle e expostos a pireno ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

6.3 Efeito Matriz

Amostras obtidas de organismos não expostos ao pireno, foram adicionadas com padrões de 1-OH pireno atingindo concentrações de 0, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Posteriormente, amostras de todas estas concentrações, foram diluídas de 5 a 100X e plotadas relacionando a fluorescência obtida pelo fator de diluição usado. Os resultados obtidos para todas as concentrações, demonstram um comportamento decrescente na fluorescência que, a partir da diluição de 25X, se torna menos acentuado e mantém uma resposta mais homogênea (Fig. 10). A diluição de 100X demonstra níveis de baixa fluorescência atingindo limites não detectáveis pelo método ($<3,15 \pm 2,85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalentes de 1-OH pireno). Desta forma, as diluições no intervalo de 25-50 são consideradas ideais para as amostras.

A ausência de efeito matriz na taxa de diluição usada nas análises (30x) é comprovada pelo paralelismo (regressões linear sem diferenças nas declividades) entre os

resultados obtidos com padrões de 1-OH pireno preparados utilizando, respectivamente, etanol/água MilliQ (1:1) (declividade = 0,2065) e amostras de urina (declividade = 0,2008) como diluentes (Fig. 11). Este paralelismo indica um comportamento semelhante entre amostras e padrões, sem interferência da matriz tanto na redução quanto no aumento da fluorescência obtida.

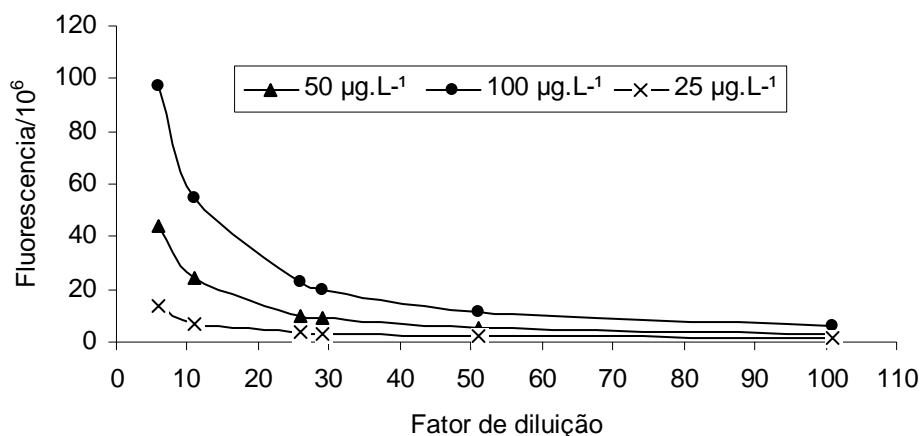


Figura 10. Influência da diluição na intensidade de fluorescência (FF) medida em urinas de siris fortificadas com 1-OH pireno (25, 50 e 100 µg.L⁻¹).

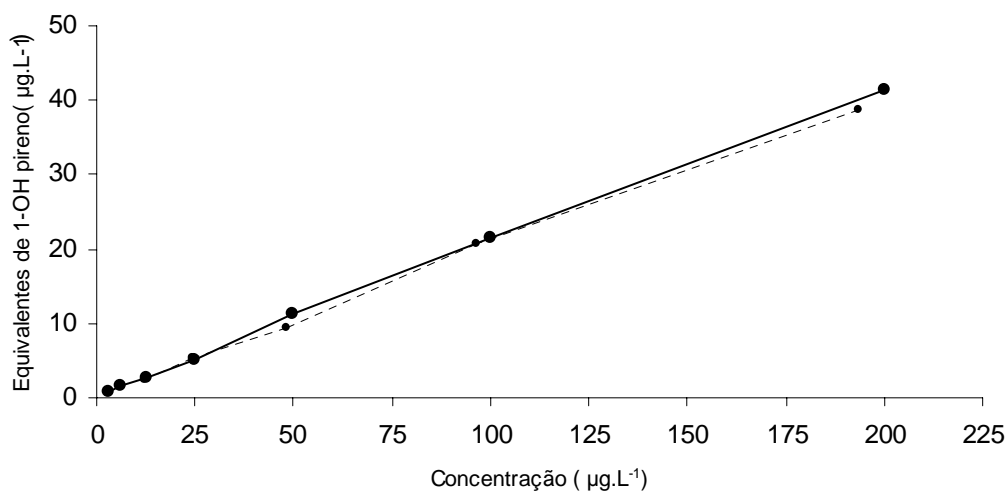


Figura 11. Paralelismo indicando ausência de efeito matriz nas amostras de urina diluídas 30X (Reta Pontilhada - amostras fortificadas com 1-OH pireno; Reta Contínua - padrões de 1-OH pireno).

6.4 Experimentos de Tempo de Exposição/Resposta

Os níveis de fluorescência máxima, associados aos metabólitos de pireno mostraram uma grande variabilidade entre indivíduos expostos sob as mesmas condições. Entretanto, cada organismo demonstrou, independente do tratamento usado, os valores máximos de fluorescência no período entre 24 e 48 horas após a exposição inicial (70% e 17% das amostras, respectivamente, n=30 organismos) (Fig. 12 e 13).

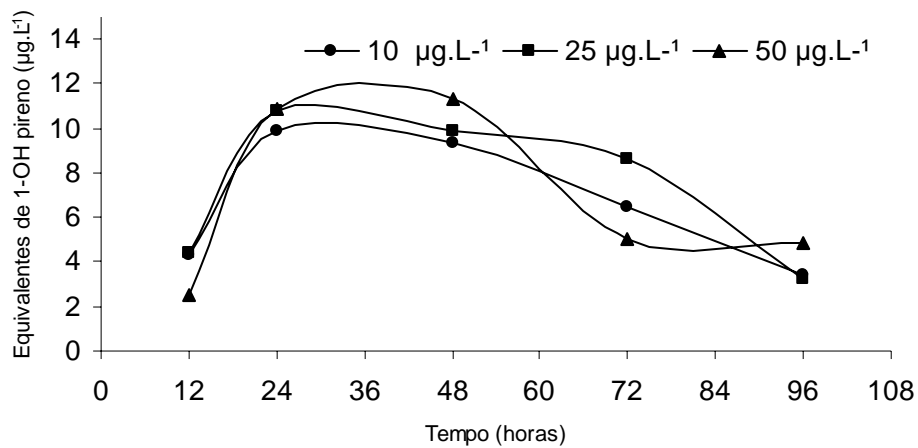


Figura 12. Metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) detectados em urina de organismos expostos a pireno (10, 25 e 50 µg.L⁻¹).

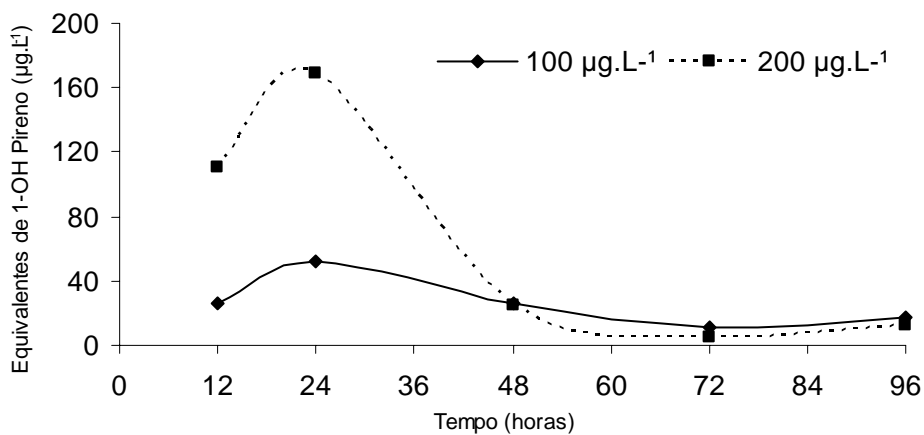


Figura 13. Metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) detectados em urina de organismos expostos a pireno (100 e 200 µg.L⁻¹).

6.5 Experimentos de Dose/Resposta

Para avaliar a capacidade do uso da espécie no monitoramento de HPAs é necessário que exista uma relação entre os níveis de exposição e a concentração detectada no organismo (relação dose/resposta). Esta relação foi avaliada através da exposição dos organismos a uma ampla gama de concentrações de pireno, sendo coletada a urina no período amostral onde foram encontrados os maiores índices de fluorescência associados aos metabólitos de pireno. Este período de tempo foi determinado no experimento de Tempo de exposição/resposta como sendo de 24 a 48 horas após a exposição inicial de pireno. Os resultados obtidos após 24 horas de exposição apresentaram uma forte relação entre as concentrações de exposição e respostas médias quantificadas na urina ($R^2 = 0,99$) (Fig. 14). Apesar da nítida tendência de uma maior resposta com o aumento da concentração de exposição, foi observada uma grande variabilidade em respostas obtidas de organismos expostos a mesmas concentrações, sendo esta variabilidade acentuada nos tratamentos 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

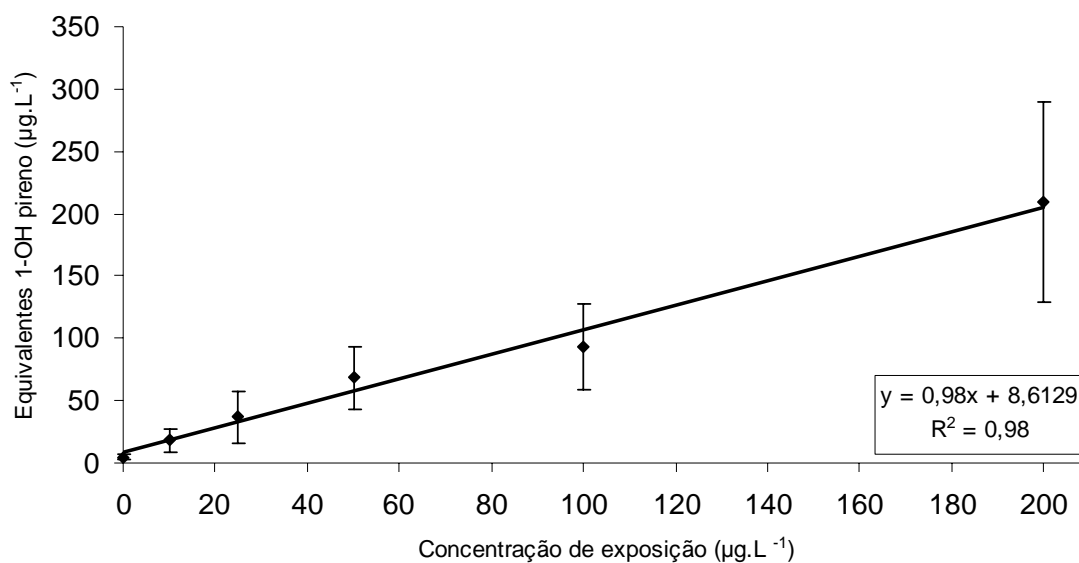


Figura 14. Concentração média (e intervalo de confiança; $\alpha=0,05$ e $n=4-8$ amostras por tratamento) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de organismos após 24 horas de exposição a pireno (0, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Para o intervalo de tempo de 48 horas também se observa uma forte relação entre as concentrações de exposição e respostas médias quantificadas na urina ($R^2 = 0,96$) (Fig. 15). Uma grande variabilidade foi novamente observada nas respostas, principalmente nos organismos expostos às maiores concentrações.

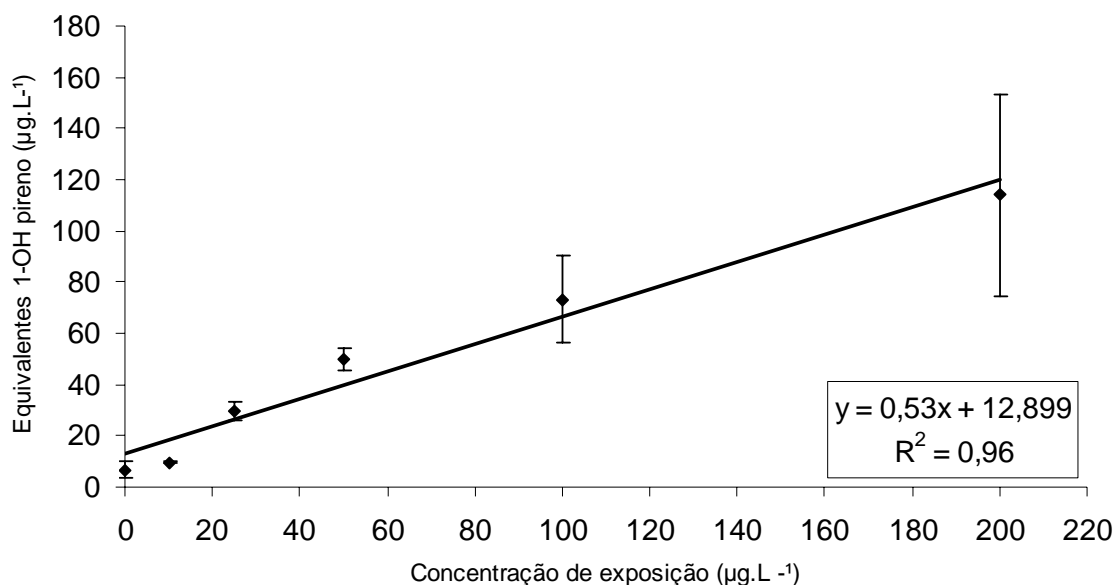


Figura 15. Concentração média (e intervalo de confiança; $\alpha=0,05$ e $n=5-8$ amostras por tratamento) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de organismos após 48 horas de exposição a pireno (0, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

6.6 Experimento de Depuração

A fim de avaliar a dinâmica de eliminação de metabólitos de pireno em um intervalo maior de tempo, amostras de urina de organismos foram coletadas até 10 dias após a exposição a 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de pireno. Assim como observado nos experimentos anteriores, existiu uma grande variabilidade nas respostas de organismos submetidos aos mesmos tratamentos. Apesar desta variabilidade, é nítida a redução nas concentrações de metabólitos de pireno na urina, com um conseqüente declínio nas taxas de excreção ao longo do tempo, principalmente entre o período compreendido entre o segundo e o sexto dia após a exposição inicial (Fig. 16). Após um período de 6 dias, as concentrações de metabólitos de pireno atingem valores de cerca da metade (nas concentrações de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e 5 vezes menores (nas concentrações de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) daqueles encontrados após 2 dias da exposição inicial. Para os organismos controle, os níveis de metabólitos representam valores inexpressivos quando comparados aos tratamentos. O que se observa também é que

mesmo após 10 dias de exposição, os níveis médios de metabólitos de pireno permanecem distintos dos controles, o que indica que parte dos compostos ainda está sendo excretada pelos organismos.

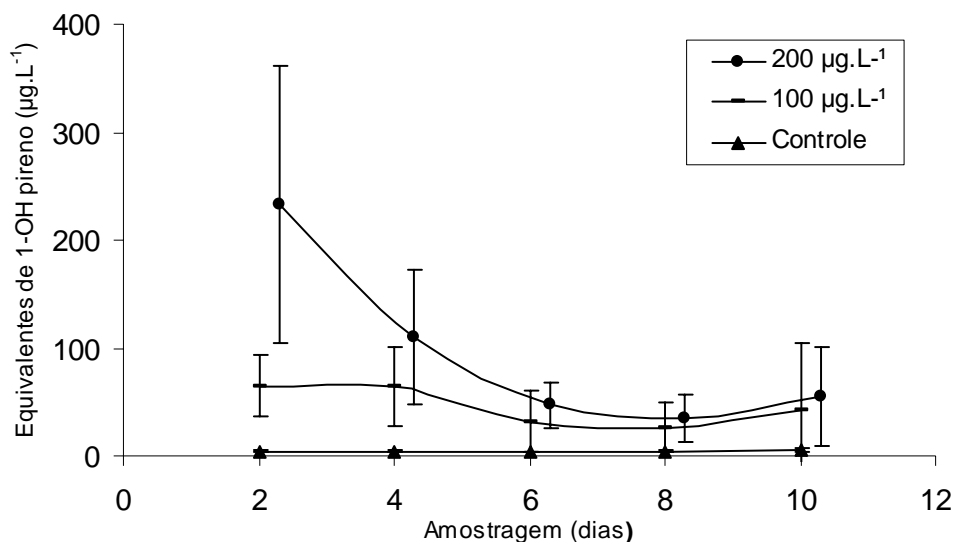


Figura 16. Concentração média (e intervalo de confiança; $\alpha=0,05$) de metabólitos de pireno (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) quantificados na urina de *Callinectes sapidus* ao longo de 10 dia após a exposição inicial a pireno (Controle - n=7-15 amostras por experimento; 100 µg.L⁻¹ - n=4-8 amostras por experimento; 200 µg.L⁻¹ - n=10-6 amostras por experimento).

6.7 Análise Estatística

6.7.1 Experimento de tempo de exposição/resposta

Um teste complementar (Student Newman-Keuls), que permite um agrupamento por homogeneidade, foi aplicado aos resultados da análise ($\alpha=0,05$). Através deste teste, foi confirmado que o experimento de tempo de exposição/resposta apresentou uma diferença significativa entre os Controles e demais tratamento para o período de 24 horas, o que já não acontece para no grupo de amostras coletadas 48 horas após a exposição.

6.7.2 Experimentos de dose/resposta

Aplicada no período de amostragem de 24 horas após a exposição inicial, a Anova de 1 Via (com teste complementar de Student Newman-Keuls) comprova que, apesar da variabilidade observada, os resultados não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre controles e todos os outros tratamentos. Através deste teste também foi verificada a semelhança entre os tratamentos mais próximos como 10 e 25, 25 e 50, 50 e 100 e 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para o período de 48 horas, a mesma análise não acusa diferenças entre tratamentos Controle, 10, 25 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ confirmando a redução na sensibilidade de distinção entre tratamentos quando coletadas amostras 48 horas após a exposição inicial.

6.7.3 Experimentos de depuração

Nos experimentos de depuração, os resultados obtidos pelos testes de Student Newman-Keuls apresentam o tratamento Controle significativamente diferentes dos demais tratamentos que demonstram ser estatisticamente semelhantes entre si nos períodos de 2-4 dias e 6-8 dias após a exposição inicial.

7 Discussão

O uso da Espectrofotometria de Fluorescência UV na análise de metabólitos de HPAs em amostras de urina de crustáceos tem sido uma das alternativas de baixo custo, rápida resposta e aplicação não destrutiva, que vem sendo aplicadas com sucesso na determinação da exposição a este grupo de contaminantes em regiões costeiras da Europa (Fillmann *et al.*, 2004; Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004b). Entretanto, crustáceos apresentam uma grande variabilidade relativa a capacidade de metabolização e

excreção de HPAs, associada principalmente a eficiência do sistema P-450 (James & Boyle, 1998). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi encontrar uma espécie, presente na região estuarina da Lagoa dos Patos, que pudesse servir como espécie indicadora da exposição a HPAs através da análise de amostras de urina por espectrofotometria de fluorescência UV.

Apesar de seu comportamento agressivo, a espécie *Callinectes sapidus* apresentou-se resistente, adaptando-se as condições de coleta e laboratoriais descritas, atendendo, portanto, a condicionantes importantes neste tipo de estudo. O processo de aclimação precisou de diversas alterações até atingir a condição adequada para os organismos. Para estudos posteriores são sugeridas adaptações como aplicação de modelos de circulação de água abertos (fluxo contínuo) ou mesmo fechados, contendo filtros biológicos, ideais para garantir um bom sistema de aclimação (Wescott, 1984). Apesar de não ter sido observado o comportamento de canibalismo, a individualização dos organismos facilitaria no controle da alimentação e ajudaria na manutenção da qualidade da água.

O sistema de coleta de urina, adaptado de Bamber & Naylor (1997), demonstrou ser uma forma eficiente, rápida e simples de obtenção de amostras, inclusive podendo ser aplicado em amostragens de campo. A capacidade de obtenção de urina de forma não destrutiva permite ainda a coleta de amostras de um mesmo organismo em diferentes períodos amostrais, acompanhando a dinâmica de metabolização dos HPAs como, por exemplo, após um derrame de óleo na região.

A capacidade metabólica apresentada por invertebrados marinhos expostos a HPAs pode variar muito entre espécies e mesmo entre contaminantes (Livingstone, 1991; Livingstone, 1998). Apesar de existirem diversas lacunas sobre metabolismo dos invertebrados marinhos, estudos demonstram a existência de um grande número de enzimas presentes em diversos grupos (ex. crustáceos, equinodermas, poliquetas e

moluscos) relacionadas a biotransformação de xenobióticos pelas principais vias metabólicas (oxidação, conjugação, hidrólise, redução e hidratação) (Livingstone, 1991). Apesar desta grande variabilidade metabólica entre espécies, a capacidade de transformação de xenobióticos parece seguir a seguinte ordem: peixes>crustáceos>poliquetas>moluscos (Livingstone, 1991; Livingstone, 1998). Entre os crustáceos, esta variabilidade pode ser comprovada em estudos que descrevem as principalmente rotas de exposição e metabolização (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b; James *et al.*, 1991; Moese & O'Connor, 1985). Diferente dos invertebrados, existe um considerável número de estudos sobre a capacidade metabólica de diferentes espécies de peixes (Aas *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2000a; Aas *et al.*, 2000b; Aas & Klungsoyr, 1998; Aas *et al.*, 1998; Ariese *et al.*, 1993; Haugland *et al.*, 2005; Beyer *et al.*, 1998). O principal foco destes estudos relaciona-se as fases I e II de transformação de xenobióticos e, conseqüentemente os compostos gerados nestes processos.

Formas oxigenadas, como 1-OH pireno, são o resultado da Fase I de transformação, mediadas pela família de enzimas conhecidas como citocromo P-450, encontrada, principalmente no fígado de peixes e hepatopâncreas de crustáceos (James & Boyle, 1998). Durante a Fase II, reações de conjugação ligam ânions orgânicos facilmente solúveis, como glicosados, sulfatados e aminoácidos, aos metabólitos formados na Fase I do metabolismo (James, 1987). Em vertebrados, a Fase II do metabolismo gera preferencialmente compostos glucorinados, enquanto que em invertebrados, a forma preferencial formada é a glucosada (Li & James, 1993; Livingstone, 1991). Desta forma, compostos glucorinados não são encontrados em amostras de urina de crustáceos (Fillmann *et al.*, 2004) (Fig. 17). Metabólitos formados por conjugação geralmente apresentam menor toxicidade que compostos não conjugados e são rapidamente excretáveis por peixes e invertebrados (Watson *et al.*, 2004b).

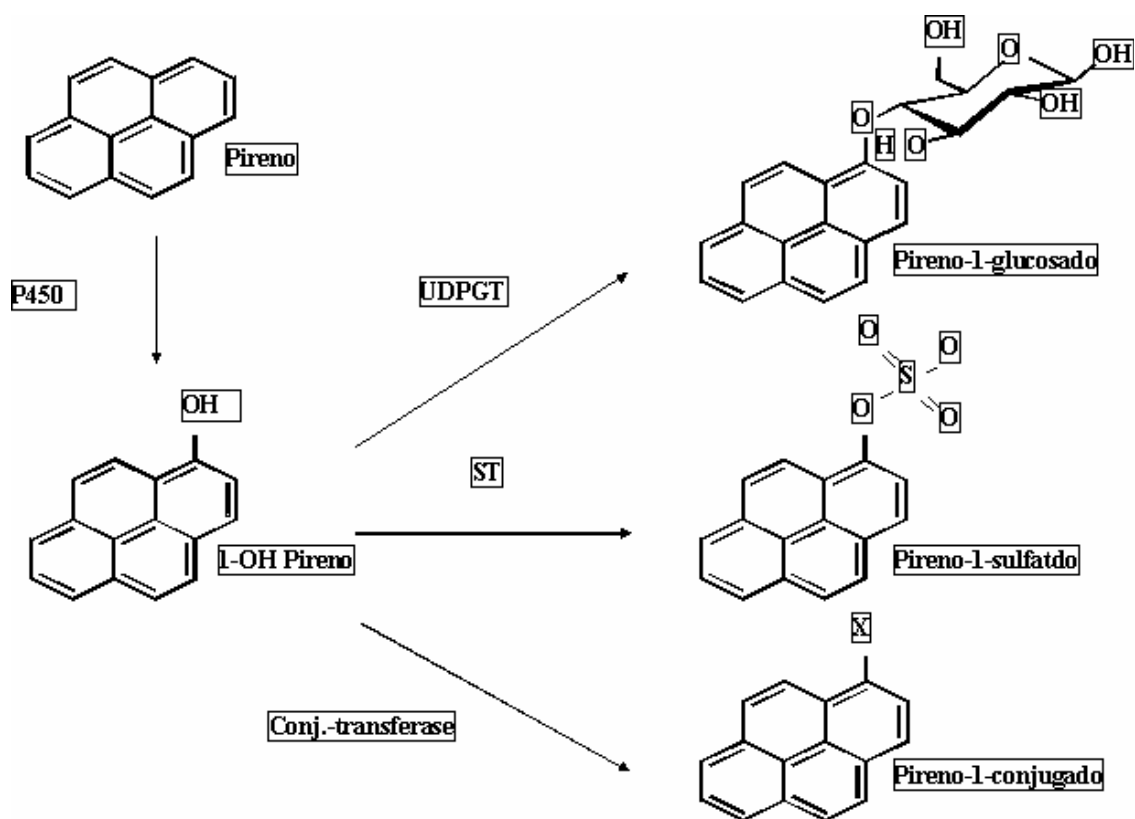


Figura 17. Representação dos metabólitos excretados pela espécie *C. maenas* exposta a diferentes concentrações de Pireno. Fonte: Fillmann et al. (2002).

Diversos estudos descrevem a formação de 1-OH pireno, e sua formas conjugadas, como metabólitos produzido pela exposição em peixes (Ruddock *et al.*, 2002; Aas *et al.*, 1998; Ariese *et al.*, 1993), poliquetas (Giessing *et al.*, 2003) e mesmo seres humanos expostos a misturas de HPAs (Jongeneelen, 2001). Em crustáceos, a metabolização de HPAs foi comprovada em uma grande variedade de espécies como *M.squiado* (derivados glicosados de naftaleno) (Corner *et al.*, 1973), *Câncer pagurus* (metabólitos conjugados de benzo(a)pireno) (Sundt & Goksoyr, 1998), *H. americanus* (conjugados sulfatados e glucosados obtidos a partir de 3-OH B(a)p) (Li & James, 1993), *Nephros norvegicus* (conjugados de fenantreno) (Solbakken & Palmork, 1981), *Pandulus platyceros* (conjugados de hidroxinaftaleno) (Angerer *et al.*, 1997) e *C.maenas* (conjugados de benzo(a)pireno (McElroy *et al.*, 1989) e conjugados de pireno (Watson *et al.*, 2004b). Os conjugados de pireno foram identificados por HPLC em *C.maenas*, indicando a presença

de pireno-1-glucosado, pireno-1-sulfatado e um metabólito não identificado. Resíduos de 1-OH pireno (<4%) foram também detectados (Fig.17) (Fillmann *et al.*, 2004).

Os estudos sobre o metabolismo da espécie *Callinectes sapidus* exposta a HPAs foram iniciados através de experimentos onde o H³-benzo(a)pireno foi absorvido (alimento e água) e transformado em hidroxibenzo(a)pireno, e outros metabólitos polares, em órgãos como hepatopâncreas, estômago, músculos, brânquias e gônadas (Lee *et al.*, 1976). Posteriormente, outros estudos relacionaram exposição a compostos orgânicos e a espécie, entre eles: Lee *et al.*, (1989) em estudo sobre a metabolização de 14 diferentes compostos, entre eles Tribtiltin, Pentaclorofenol e Benzo(a)pireno analisados através de metabólitos encontrados em amostras de hepatopâncreas; Moese *et al.*, (1985) analisando a cinética metabólica de Fenantreno pela espécie; Mothershead *et al.*, (1992) verificando a influência da ecdise na acumulação de HPAs (Ciclopenta(def)fenantreno, Fluorantreno e Pireno) em amostras de músculo e hepatopâncreas de organismos expostos a locais com reconhecida contaminação e Lee (1993) avaliando a transferência de Dinitroclorobenzeno, Hexaclorobifenil, Trifeniltin e Tributiltin e seu metabólitos para ovários e oócitos de fêmeas de *C. sapidus* e.

No presente estudo buscou-se evidenciar a capacidade da espécie *C. sapidus* em transformar pireno em compostos polares mais facilmente excretáveis. As análises de amostras de urina por FF (Ex345/Em387nm) apresentam picos com emissão em torno de 380-385nm, característicos de compostos hidroxilados e conjugados de pireno (Fillmann *et al.*, 2004). O pireno original, o qual apresenta emissão em torno de 375nm (Watson *et al.*, 2004b), não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas, indicando que os compostos detectados na urina são resultantes do processo biológicos de transformação sofridos pelo composto original, no qual os organismos foram submetidos. O método de detecção dos metabólitos de pireno em amostras de urina de *C. sapidus* por

espectrofotometria de fluorescência UV (FF) demonstrou ser bastante útil na avaliação da exposição à HPAs. Apesar da análise de metabólitos de HPAs por HPLC se mostrar uma análise mais sensível, (limites de detecção $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para HPLC e $6,2\pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para Espectrofotometria de Fluorescência UV) (Fillmann *et al.*, 2004), o uso da técnica de fluorescência apresenta como principais vantagens a rapidez na sua aplicação e reduzido custo operacional, tornando a sua aplicação ideal para uma caracterização inicial e monitoramento de zonas costeiras e estuarinas.

Os resultados dos experimentos de dose/resposta, tempo de exposição/resposta e depuração apresentaram uma grande variabilidade interindividual, acentuada nas altas concentrações de exposição. Esta variabilidade é encontrada em amostragens de campo onde são comuns variações no estado nutricional, pré-exposição a xenobióticos e concentrações de contaminantes entre locais diferentes (Watson *et al.*, 2004b). Em experimentos laboratoriais, onde um grupo homogêneo de organismos é exposto nas mesmas condições, esta variação é mais difícil de ser explicada e, provavelmente, está associada a características inerentes aos organismos, como estágios intermediários de muda, características genéticas e capacidade metabólica diferenciada relacionada a indução e eficiência do sistema de enzimas P-450 (Carr & Neff, 1988). Para a espécie *C. sapidus*, os estágios intermodais podem representar diferenças significativas na assimilação de HPAs em locais contaminados (Mothershead & Hale, 1992). Estes autores sugerem que os elevados níveis de HPAs em organismos que sofreram a muda recentemente está relacionado a um aumento na permeabilidade da nova carapaça, além de uma redução na capacidade metabólica destes organismos durante o processo de muda. Um importante ponto a ser considerado é o período de aclimação. Um período de 5 a 7 dias pode não ser suficiente para a adaptação da espécie a estudos laboratoriais e merece atenção em estudos posteriores. Outro importante fator apresentado como interferente na acentuada

variabilidade das respostas é a eliminação de urina pelo organismo. Como, através da metodologia de coleta usada, não é possível armazenar amostras de urina, a eliminação desta pode ocorrer em qualquer intervalo de tempo, inclusive entre as amostragens. Desta forma, a amostra coletada pode não representar a fração efetivamente metabolizada e excretada pelo organismo. Provavelmente também associado a grande variabilidade dos dados, está o baixo n amostral dos experimentos. Aumentando o número de testes, poderíamos reduzir esta variação entre indivíduos expostos a mesmos tratamentos.

Apesar da grande variabilidade encontrada nas respostas (expressadas em equivalentes de 1-OH pireno) em organismos expostos a mesmos tratamentos, os resultados demonstraram que o pico de excreção ocorre 24 horas após a exposição. As análises estatísticas no experimento de tempo de exposição/resposta confirmam que o predomínio da excreção de metabólitos ocorre nos períodos iniciais de amostragem (12 até 48h). Uma comparação com a espécie de *C. maenas*, que apresenta o período de excreção máxima 48 horas após a exposição inicial (Fillmann *et al.*, 2004), indica que *C. sapidus* possui uma velocidade maior de metabolização e excreção de metabólitos de pireno.

Comparando as espécies *C. maenas* (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b) e *C. sapidus* (presente estudo), ambas com comprovada capacidade de metabolizar HPAs, encontramos vantagens e desvantagens associadas a cada uma delas como bioindicadoras de exposição a HPAs. O comportamento agressivo apresentado pelo *C. sapidus* representa uma desvantagem na adaptação laboratorial e amostragem de urina. Por outro lado, a quantidade de urina nesta espécie supera consideravelmente a obtida na espécie *C. maenas*. Com relação a aplicação em amostragens de campo, a grande capacidade natatória de *C. sapidus* dificultaria a aplicação da metodologia (Tabela 3). Isto ocorreria porque amostras obtidas de organismos poderiam não representar os níveis de HPAs do local de coleta. Entretanto, o uso de gaiolas seria uma alternativa para a aplicação desta metodologia,

tendo sido usada com sucesso na avaliação da contaminação por HPAs em peixes (Baumard *et al.*, 1998a). Por outro lado, a espécie possui uma ampla distribuição global que propicia a aplicação e validação da metodologia em diversos locais do mundo.

Tabela 3. Quadro comparativo entre as espécies *C. sapidus* e *C. maenas*.

Parâmetros	<i>Carcinus maenas</i>	<i>Callinectes sapidus</i>
Aclimação	Espécie de fácil aclimação	Dificultada pela agressividade mortandade
Obtenção de amostras	Espécie de fácil manipulação	Dificultada pela agressividade
Velocidade de excreção	Pico em 48 horas	Pico em 24 horas
Capacidade de depuração*	Decréscimo acentuado 2 dias após exposição	Decréscimo acentuado 2-4 dias após exposição
Mobilidade	Baixa	Alta
Aplicação da técnica	Inglaterra e Noruega	Nenhum trabalho
Distribuição ambiental	Restrita a ambientes temperados	Distribuição Global

De acordo com Aas *et al.* (2000b) a aplicação da técnica de fluorescência no módulo FF tem como pré-requisito básico a existência de uma relação entre dose/resposta. Esta relação foi verificada em diversos estudos utilizando amostras de bile de peixes (Aas *et al.*, 2000b; Aas *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 1998) e urina de *Carcinus maenas* (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b). No presente trabalho, foi comprovada uma forte relação entre os níveis de exposição e metabólitos de pireno ($R^2 > 0,9$) obtidos nas amostras de urina coletadas 24 horas após a exposição inicial. Apesar de também apresentar uma forte relação dose/resposta ($R^2 > 0,9$), os níveis de metabólitos em amostras de urina coletadas após 48 horas de exposição sofrem uma nítida perda de sensibilidade. Os níveis de metabólitos (expressos em equivalentes de 1-OH pireno) aparecem aproximadamente 50% menores do que aqueles encontrados em amostras coletadas 24 horas após a exposição inicial, o que acarreta na redução da sensibilidade da técnica.

A capacidade de excreção a um longo período de tempo, avaliada pelos experimentos de depuração, apresentam um acentuado declínio após 2 de exposição para o tratamento de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4 dias no tratamento de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Apesar desta queda, os níveis de metabólitos de pireno permanecem significativamente diferentes daqueles encontrados nos organismos mantidos como Controle, mesmo 10 dias após a exposição inicial. Esta cinética de redução é semelhante aquela apresentada por *C. maenas* que, depois de 10 dias, apresentaram níveis de metabólitos de pireno semelhantes aos encontrados 12 horas depois da exposição (Fillmann *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004b). Esta comparação é limitada uma vez que os experimentos de depuração com *C. maenas* tiveram renovação diária de água (Fillmann, com. pessoal), enquanto que a água contida nos aquários dos experimentos com *C. sapidus* foi trocada pela primeira vez 4 dias após a exposição inicial e, a partir daí, de 2 em 2 dias. Taxas de redução nos níveis de metabólitos de HPAs analisados através de técnicas que utilizam a fluorescência, também foram avaliadas para outros organismos. Para a espécie *Cancer pagurus*, níveis máximos de fluorescência foram obtidos 10 dias após a injeção pericardial de Benzo(a)pireno (B(a)p), níveis estes mantidos significativamente diferentes dos Controles mesmo após 30 dias (Sundt & Goksoyr, 1998). Metabólitos de B(a)p na espécie de bacalhau *Gadus morhua* apresentaram um pico máximo 3 dias após a exposição, seguindo um decréscimo gradual até 28 dias (Aas *et al.*, 2000b). Para a espécie de peixe *Scophthalmus maximus* exposta a concentrações de 0,1 a 2,0 mg.L^{-1} de petróleo, os níveis máximos de metabólitos de pireno, medidos através de fluorescência (FF), foram encontrados entre 24 e 96 horas após a exposição, retornando a níveis basais após 9 dias de depuração (Camus *et al.*, 1998).

A rápida capacidade de eliminação de metabólitos de HPAs por diversas espécie de peixes dificulta a aplicação das técnicas de fluorescência UV na caracterização da contaminação ambiental por HPAs (Aas *et al.*, 1998). No entanto, análises em amostras de

bile de peixes são indicadas para o monitoramento de níveis imediatos, relacionados a mudanças rápidas de concentrações de HPAs como, por exemplo, derrames de petróleo (Johnston & Baumann, 1989). No presente estudo, a espécie *C. sapidus* demonstra efetiva capacidade de excreção de metabólitos de pireno, podendo ser indicada para o mesmo objetivo.

Um importante ponto a ser considerado são as rotas de exposição e assimilação. É reconhecida a afinidade de HPAs a sedimentos ou matéria orgânica (Kennish, 1997). A absorção de material sedimentado torna-se especialmente importante em animais bentônicos, principalmente omnívoros, como é o caso da espécie *Callinectes sapidus* (Mothershead & Hale, 1992). Entretanto, análises de metabólitos encontrados em amostras de urina representam a forma de excreção de todas as rotas de exposição na qual o organismo é submetido (sedimentos, partículas em suspensão, alimento e água). Desta forma, a aplicação desta técnica em condições reais de campo indicariam, para a espécie, *C. sapidus*, as frações de HPAs assimiladas a partir da ingestão (alimentos ou partículas sedimentadas/suspensão), respiração (troca de água via branquial) e contato direto com a superfície do corpo.

Apesar de possibilitar medidas qualitativas da exposição a vários grupos de HPAs, a espectrofotometria UV não possibilita uma avaliação dos efeitos deletérios causados pela exposição a estes contaminantes. Para avaliar o risco causado por esta exposição em crustáceos, é sugerida a combinação entre a espectrofotometria UV e técnicas de biomarcadores enzimáticos, histológicos e bioquímicos, tanto em estudos laboratoriais como amostragens em campo.

A eficiência e a utilidade da metodologia para *Carcinus maenas* foi comprovada em condições de campo, onde as técnicas de fluorescência (FF e SFS) são apresentadas como de reconhecida aplicação para discriminar entre organismos expostos e não expostos a

HPAs (Dissanayake & Galloway, 2004; Watson *et al.*, 2004b). Entretanto, em amostras de campo, a presença de diversos HPAs ou mesmo metabólitos gerados por organismos expostos a estes, podem interferir nas análises por fluorescência (Dissanayake & Galloway, 2004). Aplicando a fluorescência no módulo FF em três pares fixos de comprimento de onda, Ex290/Em335 (identificando compostos de 2-3 anéis), Ex341/Em383 (compostos de 4 anéis), Ex380/Em430 (compostos de 5 anéis), é possível detectar a presença dos três grupos prioritários de HPAs. A aplicação do módulo SFS usando $\Delta\lambda$ of 37 ou 42nm forneceria resultados semelhantes (Aas *et al.*, 2000b). Entretanto, o uso de SFS sobrepõe sinais nas amostras de campo contendo uma diversidade de compostos, simplificando o espectro obtido. A abundância local e importância ecológica da espécie no Estuário da Lagoa dos Patos, assim como em toda costa brasileira, representam importantes vantagens no futuro uso da espécie como bioindicadora da contaminação por HPAs nesta, ou mesmo em outra, região. Os dados aqui apresentados corroboram com a afirmativa de que a espécie *C. sapidus* possui um grande potencial na aplicação desta nova metodologia de avaliação da exposição a HPAs.

8 Conclusões

A espécie *Callinectes sapidus* se mostrou apropriada para a utilização em experimentos de metabolização de HPAs (pireno) em condições de laboratório.

A técnica de fluorescência descrita demonstra sensibilidade adequada para detecção de metabólitos de pireno em amostras de urina da espécie testada, sendo considerada uma medida adequada de exposição ao pireno.

A metodologia testada apresenta baixa interferência da matriz nas análises, sendo que apenas uma diluição simples ($\geq 1:30$) é necessária para o preparo da amostras antes da

leitura. Desta forma, um grande número de amostras pode ser analisado em um curto intervalo de tempo.

A espécie demonstrou capacidade de metabolizar o pireno, e possivelmente também outros HPAs, em compostos de maior polaridade facilmente excretados através da urina. A taxa de metabolização observada para o pireno foi bastante alta, atingindo um pico de excreção em apenas 24 horas após a exposição inicial.

A existência de uma relação entre as concentrações de exposição e os níveis excretados na urina (relação dose/resposta) comprova que a espécie testada pode ser utilizada, não só na identificação da exposição aos HPAs, mas também na distinção entre diferentes intensidades de exposição.

Portanto, a utilização da espectrofotometria de fluorescência UV, aplicada em amostras de urina da espécie *Callinectes sapidus*, apresenta-se como uma metodologia viável para utilização em estudos de exposição a HPAs. Estas análises representam uma forma não destrutiva, de baixo custo e rápida resposta da fração bioassimilável deste grupo de contaminantes.

9 Considerações Futuras

- Uma vez estabelecidos os níveis de metabólitos de HPAs em amostras de urina, sugere-se analisar a distribuição destes contaminantes em outros tecidos, o que poderia reduzir a variabilidade atribuída a freqüente liberação da urina pelo organismo.

- A metodologia poderia ser implementada pela introdução de coletores ligados aos nefroporos, que armazenariam a urina em um determinado período. Isso contribuiria ainda mais para a redução da variabilidade dos resultados, além de facilitar as coletas de urina por dispensar o uso de lupas.

- Analisar quali-quantitativamente os metabólitos formados pelo *C. sapidus* no processo de depuração do pireno através de técnicas de cromatografia líquida (HPLC), visando uma melhor compreensão do processo de metabolização.

- Aplicar a metodologia em condições de campo, através do uso de gaiolas que permitam um maior controle da mobilidade e tempo de exposição dos organismos, buscando o discernimento entre locais contaminados e não contaminados por HPAs.

- Identificar ou desenvolver técnicas de biomarcadores enzimáticos ou celulares que possibilitem avaliar os efeitos da exposição a este grupo de contaminantes.

10 Referências Bibliográficas

Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B. & Andersen, O.K. (2000a). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51, 241-258.

Aas, E., Beyer, J. & Goksoyr, A. (1998). PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Marine Environmental Research* 46, 225-228.

Aas, E., Beyer, J. & Goksoyr, A. (2000b). Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5, 9-23.

Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L. & Andersen, O.K. (2001). Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Marine Environmental Research* 52, 213-229.

- Aas, E. & Klungsoyr, J. (1998). PAH metabolites in bile and EROD activity in North Sea fish. *Marine Environmental Research* 46, 229-232.
- Al-Lihaibi, S.S. & Ghazi, S.J. (1997). Hydrocarbon distributions in sediments of the open area of the Arabian Gulf following the 1991 Gulf War oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 34, 941-948.
- Angerer, J., Mannschreck, C. & Gundel, J. (1997). Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: Biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 69, 323-331.
- Ariese, F., Kok, S.J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N.H. & Hofstraat, J.W. (1993). Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology* 26, 273-286.
- Bamber, S.D. & Naylor, E. (1997). Sites of release of putative sex pheromone and sexual behaviour in female *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44, 195-202.
- Barrick, R.C. & Prahl, F.G. (1987). Hydrocarbon geochemistry of the Puget Sound region. 3. polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 25, 175-191.
- Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P. (1997). Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359, 502-509.

- Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P. (1998a). PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin* 36, 577-586.
- Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P. (1998b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 765-776.
- Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H.K. & Ravn, P. (1998). Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Marine Environmental Research* 46, 233-236.
- Burgeot, T. (1996). Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Marine Pollution Bulletin* 32, 39-46.
- Burt, J.S. & Ebell, G.F. (1995). Organic pollutants in mussels and sediments of the coastal waters off Perth, Western Australia. *Marine Pollution Bulletin* 30, 723-732.
- Camus, L., Aas, E. & Borseth, J.F. (1998). Ethoxyresorufin-O-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to a dispersed topped crude oil in a continuous flow system. *Marine Environmental Research* 46, 29-32.
- Carr, R.S. & Neff, J.M. (1988). Influence of prior exposure to xenobiotics on the metabolism and distribution of polychlorinated biphenyls and phenanthrene in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Environmental Research* 24, 73-77.

- CETESB (2002). Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros. Companhia de Saneamento Ambiental, Apostila de Treinamento, Diretoria de Desenvolvimento de Tecnologia, 269 p.
- Clark, R.B. (1997). *Marine Pollution*, Oxford University Press, Oxford, 2001, pp. 237.
- Corner, E.D.S., Kilvington, C.C. & O'Hara, S.C.M. (1973). Qualitative studies on the metabolism of naphthalene in *Maia squinado* (Herbst). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 53, 819-832.
- DeLaune, R.D., Hambrick, I.I.I. & Patrick, J. (1980). Degradation of hydrocarbons in oxidized and reduced sediments. *Marine Pollution Bulletin* 11, 103-106.
- Dissanayake, A. & Galloway, T.S. (2004). Evaluation of fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrophotometry as a biomonitoring tool of environmental contamination. *Marine Environmental Research* 58, 281-285.
- Eickhoff, C.V. & Law, F.C.P. (1995). A urine collection system for studying the excretion of xenobiotics from dungeness crabs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 33, 23-27.
- Escartin, E. & Porte, C. (1999). Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Marine Pollution Bulletin* 38, 1200-1206.
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141, 353-365.
- Fillmann, G. (2001). Appraisal and validation of rapid, integrated chemical and biological assays of environmental quality. Doutorado, 170 p.

- Fillmann, G., Watson, G.M., Francioni, E., Readman, J.W. & Depledge, M.H. (2002a). A non-destructive assessment of the exposure of crabs to PAH using ELISA analyses of their urine and haemolymph. *Marine Environmental Research* 54, 823-828.
- 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. *Environmental Science and Technology* 38, 2649-2656.
- Fillmann, G., Zamboni, A., Bicego, M.C., Depledge, M.H. & Readman, J.W. (2002b). Evaluation of ELISAs for the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment. *Science of the Total Environment*.
- Fossi, M.C., Casini, S., Savelli, C., Corbelli, C., Franchi, E., Mattei, N., Sanchez-Hernandez, J.C., Corsi, I., Bamber, S. & Depledge, M.H. (2000). Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo([alpha])pyrene. *Chemosphere* 40, 861-874.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B. & Depledge, M.H. (2004). A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology* 38, 1723-1731.
- Galloway, T.S., Sanger, R.C., Fillmann, G., Readman, J.W., Smith, K.L., Ford, T.E. & Depledge, M.H. (2002). Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassay. *Environmental Science and Technology* 36, 2213-2218.
- Giessing, A.M.B., Mayer, L.M. & Forbes, T.L. (2003). 1-Hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-

- feeding polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1107-1114.
- Guerin, J.L. & Stickle, W.B. (1997). A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 218, 165-186.
- Guzzella, L. & DePaolis, A. (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 28, 159-165.
- Haugland, C., Ugland, K.I., Borseth, J.F. & Aas, E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in capelin (*Mallotus villosus*) in the Barents Sea by use of fixed wavelength fluorescence measurements of bile samples. *Marine Pollution Bulletin* 50, 102-104.
- Hines, A.H., Lipcius, R.N. & Haddon, A.M. (1987). Population dynamics and habitat partitioning by size, sex and molt stage of blue crab *Callinectes sapidus*, in a subestuary of central Chesapeake Bay. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 36, 55-64.
- Ibagy, A. (1997). Composição, Distribuição e Variação Nictimeral do Ictioplâncton do Estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Mestrado, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 127 p.
- James, M.O. (1987). Conjugation of organic xenobiotics in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives* 71, 97-103.

- James, M.O. (1989). Biotransformation and disposition of PAH in aquatic invertebrates. In: U. Varanasi (eds.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 69-92.
- James, M.O., Barron, M.G. & Schell, J.D. (1988). Conjugation and excretion of phenolic compounds by the lobster, *Homarus americanus*. *Bulletin. Mount Desert Island Biological Laboratory* 27, 9-11.
- James, M.O. & Boyle, S.M. (1998). Cytochromes P450 in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 121, 157-172.
- James, M.O., Schell, J.D., Barron, M.G. & Li, C.L.J. (1991). Rapid, dose dependent elimination of phenol across the gills, and slow elimination of phenyl sulfate in the urine of phenol dosed lobsters, *Homarus americanus*. *Drug Metabolism and Disposition* 19, 536-542.
- Johnston, E.P. & Baumann, P.C. (1989). Analysis of fish bile with HPLC/fluorescence to determine environmental exposure to benzo(a)pyrene. *Hydrobiologia* 188, 561-566.
- Jongeneelen, F.J. (1997). Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science of the Total Environment* 199, 141-149.
- Jongeneelen, F.J. (2001). Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Annals of Occupational Hygiene* 45, 3-13.

- Jonsson, G., Sundt, R.C., Aas, E. & Beyer, J. (2004). An evaluation of two fluorescence screening methods for the determination of chrysene metabolites in fish bile. *Chemosphere* 56, 81-90.
- Kayal, S. & Connell, D.W. (1995). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in biota from the Brisbane River Estuary, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 40, 475-493.
- Kayal, S.I. & Connell, D.W. (1989). Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and water from the Brisbane river estuary, Australia. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 29, 473-487.
- Kennish, M. (1997). Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. *Petralia Publications*, Boca Raton. 523 p.
- Krahn, M.M., Collier, T.K. & Malins, D.C. (1982). Aromatic hydrocarbon metabolites in fish: automated extraction and high-performance liquid chromatographic separation into conjugate and non-conjugate fractions. *Journal of Chromatography A* 236, 429-440.
- Kurelec, B. (1993). The genotoxic disease syndrome. *Marine Environmental Research* 35, 341-348.
- LaFlamme, R.E. & Hites, R.A. (1978). The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 42, 289-303.
- Law, R.J., Dawes, V.J., Woodhead, R.J. & Matthiessen, P. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. *Marine Pollution Bulletin* 34, 306-322.

- Lee, R.F., Ryan, D. & Neuhauser, M.L. (1976). Fate of petroleum hydrocarbons taken up from food and water by the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Biology* 37.
- Lee, R.F. (1989). Metabolism and accumulation of xenobiotics within hepato-pancreas cells of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research* 28, 93-97.
- Leonard, J.D. & Hellou, J. (2001). Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 618-623.
- Levin, J.O., Rhen, M. & Sikstrom, E. (1995). Occupational PAH exposure: urinary 1-hydroxypyrene levels of coke-oven workers, aluminum smelter pot-room workers, road pavers, and occupationally non-exposed persons in Sweden. *Science of the Total Environment* 163, 169-177.
- Li, C.L.J. & James, M.O. (1993). Glucose and sulfate conjugations of phenol, beta-naphthol and 3-hydroxybenzo(a)pyrene by the American lobster (*Homarus americanus*). *Aquatic Toxicology* 26, 57-72.
- Lin, E.L.C., Cormier, S.M. & Racine, R.N. (1994). Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 707-715.
- Lipiatou, E. & Saliot, A. (1991). Fluxes and transport of anthropogenic and natural polycyclic aromatic hydrocarbons in the Western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 32, 51-71.

- Livingstone, D.R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: D.F. Houlihan, D.R. Livingstone, and R.F. Lee (eds.), *Advanced in comparative and environmental physiology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 45-185.
- Livingstone, D.R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 43-49.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W. & Teal, J.M. (1989). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: U. Varanasi (eds.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 1-39.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelao, R.M., Del Rosso, C., Fillmann, G. & Zamboni, A.J. (2005). Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environment International* 31, 77-87.
- Moese, M.D. & O'Connor, J.M. (1985). Phenanthrene kinetics in blue crab from dietary sources. *Marine Environmental Research* 17, 254-257.
- Mothershead, I.I. & Hale, R.C. (1992). Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Marine Environmental Research* 33, 145-156.
- Pandey, P., McGowen, R.M., Vogel, E.W. & Butterworth, F.M. (1995). Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the *White/White+* eye-mosaic assay. In: F.M. Butterworth, L.D. Corkum, and J.

- Guzman-Rincon (eds.), *Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change: A handbook*. Plenum Press, New York. pp. 183-191.
- Pearson, W.H., Miller, S.E., Blaylock, J.W. & Olla, B.L. (1981). Detection of the water-soluble fraction of crude oil by the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research* 5, 3-11.
- Porte, V.C. & Escartin, E. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in fish bile: A tool to assess PAH transport to the deep-sea environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 126, 122.
- Rand, G.M. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment*, 2^o edição; Taylor & Francis; Washington, DC. 1125 p.
- Readman, J.W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., Cattini, C. & Mee, L.D. (2002). Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin* 44, 48-62.
- Readman, J.W., Mantoura, R.F.C., Rhead, M.M. & Brown, L. (1982). Aquatic distribution and heterotrophic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the Tamar estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 14, 369-389.
- Reible, D.D., Popov, V., Valsaraj, K.T., Thibodeaux, L.J., Lin, F., Dikshit, M., Todaro, M.A. & Fleeger, J.W. (1996). Contaminant fluxes from sediment due to tubificid oligochaete bioturbation. *Water Research* 30, 704-714.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J. & McCalley, D.V. (2002). Bile metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 97-105.

- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McEvoy, J. & Peters, L.D. (2003). Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *The Science of The Total Environment* 301, 105-117.
- Santos, M.d.C.F. (2002). Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133, 29-42.
- Seeliger, U., Odebrecht, C. & Castello, J.P. (1997). Subtropical Convergence Environments: the coast and the sea in the Southern Atlantic. Germany7 Springer Verlag. 307p.
- Sherry, J. (1975). Uptake, Metabolism, and Distribution of DDT in Organs of Blue Crab, *Callinectes sapidus*. *Chesapeake Science* 16, 20-26.
- Solbakken, J.E., Palmork, K.H., Neppelberg, T. & Scheline, R.R. (1980). Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 46, 127-132.
- Solbakken, J.E. & Palmork, K.H. (1981). Metabolism of phenantherene in various marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 70, 21-26.
- Stegeman, J.J. & Livingstone, D.R. (1998). Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 121, 1-3.

- Sundt, H. & Goksoyr, A. (1998). In vivo and in vitro biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the edible crab, *Cancer pagurus*. *Marine Environmental Research* 46, 515-519.
- Vo-Dihn, T. (2005). Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical Chemistry* 50, 396-401.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neil, G.P. & Bavor Jr, H.J. (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Science of the Total Environment* 112, 203-219.
- Watson, G.M., Andersen, O.-K., Depledge, M.H. & Galloway, T.S. (2004a). Detecting a field gradient of PAH exposure in decapod crustacea using a novel urinary biomarker. *Marine Environmental Research* 58, 257-261.
- Watson, G.M., Andersen, O.K., Galloway, T.S. & Depledge, M.H. (2004b). Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. *Aquatic Toxicology* 67, 127-142.
- Wei, C. & Chan, K.H. (2000). The prediction of partitioning coefficients for chemicals causing environmental concern. *Science of the Total Environment* 248, 1-10.
- Wescott, W. (1984). A guide to soft shell crabbing. UNC Sea Grant College Publication UNC-SG-84-01. 32 p.
- Witehouse, B.G. (1984). The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry* 14, -319.
- Witt, G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 31, 237-248.

Yang, G.P. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environmental Pollution* 108, 163-171.

Zanardi, E., Bicego, M.C., deMiranda, L.B. & Weber, R.R. (1999). Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 38, 261-267.

