

**Uso de ferramentas químicas e biológicas na avaliação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)**

**Use of chemical and biological tools in the evaluation of contaminated environments with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)**

**Larissa de Souza Pinto Nogueira, Inogueiraventura@gmail.com**

**Thaís de Almeida Pedrete<sup>1</sup>**

**Adriana Haddad Nudi**

**Angela de Luca Rebello Wagener**

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

Submetido em 13/05/2016

Revisado em 20/05/2016

Aprovado em 21/10/2017

**Resumo:** HPAs em água e em mexilhões *P. perna* foram determinados por GC/MS e biomarcadores micronúcleo e vermelho neutro na hemolinfa dos organismos, em duas campanhas no Quadrado da Urca, para verificação da qualidade ambiental local. Os biomarcadores foram compatíveis com as concentrações de HPAs encontradas nos mexilhões, refletindo o impacto no ambiente e efeito nas células. Detectou-se presença de compostos petrogênicos e pirolíticos. *P. perna* se apresenta como bom biomonitor para avaliação de HPAs.

**Palavras chave:** Biomonitoramento. Biomarcadores. HPAs. *Perna perna*.

**Abstract:** PAHs in water and mussels *P. perna* were determined by GC/MS and micronucleus and neutral red were analyzed in the hemolymph of the organisms in two samplings at Quadrado da Urca, for environmental quality assessment. Biomarkers results were consistent with PAHs concentrations found in mussels, reflecting the environmental impact and consequent effect on cells. It was detected the presence of petrogenic and pyrolytic compounds. *P. perna* may be considered as good biomonitor for PAHs evaluation.

**Keywords:** Biomonitoring. Biomarkers. PAHs. *Perna perna*.

<sup>1</sup> Instituição atual: Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP/FIOCRUZ, RJ.

## 1. Introdução

A contaminação ambiental por agentes químicos ocorre de forma natural (exsudação, fontes biogênicas) e/ou accidental em decorrência da ação antrópica (derrame de óleo, queima de combustíveis fósseis, ocupação desordenada). Os ecossistemas marinhos acabam constituindo-se como receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de contaminantes (MORAES, 2001).

Dentre os contaminantes amplamente distribuídos no meio ambiente, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) destacam-se devido às atividades relacionadas à extração, ao transporte, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados. Além disso, os HPAs apresentam alta lipofilicidade, sendo prontamente absorvidos pelos seres vivos, e sua análise pode revelar se provém de introdução direta de petróleo no ambiente (poluição, derramamentos) ou de processos de combustão (uso do petróleo como combustível). Os HPAs são metabolizados pelos órgãos internos dos seres vivos, transformados em compostos detectáveis que, encontramos nos organismos, podem ser utilizados como biomarcadores da exposição ao petróleo e seus derivados (NUDI *et al.*, 2007).

Os HPAs são compostos químicos constituídos de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Existem mais de 100 HPAs reconhecidos pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), sendo que 16 destes são considerados prioritários para USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency*), em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica.

O biomonitoramento tornou-se uma importante ferramenta em programas de avaliação ambiental, uma vez que a biodisponibilidade dos contaminantes é medida diretamente nos organismos bioindicadores. O biomonitoramento é uma prática que avalia a saúde ambiental de ecossistemas aquáticos e, consequentemente, a qualidade de suas águas e pode ser dividido em passivo ou ativo. No biomonitoramento passivo, conforme empregado neste estudo, utiliza-se animais coletados diretamente de seus habitats, onde a população natural existe (PAVANELLO e LOTTI, 2014).

Moluscos bivalves têm sido extensivamente empregados em programas de biomonitoramento para a avaliação da contaminação de ambientes aquáticos. Esses organismos são adequados como monitores biológicos de áreas contaminadas, pois eles são: sésseis, filtradores, de fácil coleta, estão presentes ao longo de todo o ano e respondem rapidamente às variações das concentrações de contaminantes no meio (FRANCIONI *et al.*, 2007a).

Para avaliar as respostas biológicas produzidas pela presença de certas substâncias químicas no ambiente, biomarcadores tem sido empregados, e estes fornecem dados sobre o efeito dos poluentes, sendo utilizados de maneira integrada com as análises químicas nos programas de monitoramento. O uso de biomarcadores fornece uma indicação sensitiva de exposição aos HPAs, pois indica a ocorrência destes compostos no meio ambiente, a disponibilidade dos mesmos para a captação por um organismo e a capacidade deste de biotransformá-los (WALKER, 2008; FAN, 2014).

A fim de avaliar o impacto de contaminantes no ecossistema, é preciso considerar alterações em componentes subcelulares altamente estruturais e funcionais, como os lisossomos, os quais acumulam uma grande variedade de compostos tóxicos. Danos lisossomais são expressos como um aumento na permeabilidade da membrana das lipoproteínas e estão bem estabelecidos como um biomarcador de estresse induzido pelo contaminante (MOORE *et al.*, 2006). Uma das mais técnicas comumente utilizadas é o ensaio do vermelho neutro, o qual quantifica o número de células viáveis e intactas após a sua exposição a tóxicos e baseia-se na absorção por difusão passiva e subsequente acumulação lisossomal do corante vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina cloridrato), usando o tempo como determinante do efeito (WEYERMANN *et al.*, 2005). A eficiência da retenção do corante depende do pH do lisossomo e da bomba de prótons H<sup>+</sup>-ATPase encontrada na membrana lisossômica. Na presença de um xenobiótico a eficiência da bomba de prótons H<sup>+</sup>-ATPase encontrada na membrana lisossômica pode ser reduzida, resultando na diminuição do gradiente de prótons e no aumento do pH no interior dos lisossomos, e consequentemente ocorre a desprotonização do corante, que não é mais retido pelos lisossomos (SOUZA *et al.*, 2011). Desde então, diversos estudos tem sido conduzidos utilizando esta técnica como uma medida de

citotoxicidade e como indicador da saúde de organismos expostos a diferentes xenobióticos (FRANCIONI *et al.*, 2005; 2007a; SOUZA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014).

Outro biomarcador celular amplamente empregado é o micronúcleo (MN), que representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (clastogênese) ou dano no aparelho mitótico (aneugênese), ou seja, é formado por condensação de fragmentos cromossomais ou de cromossomas inteiros que não estão incluídos no núcleo principal após a anáfase. Os MNs são envolvidos pela membrana nuclear durante a telófase e podem ser visualizados no citoplasma. Os danos no DNA causados pela exposição a agentes mutagênicos são expressos em MN após um ciclo de divisão celular (ARALDI *et al.*, 2015). A formação de MN tem sido utilizada em epidemiologia molecular como biomarcador de danos microssomais e instabilidade genômica de organismos marinhos expostos a uma variedade de compostos tóxicos e poluentes genotóxicos (YOSHIMINE *et al.*, 2012; CORTEZ *et al.*, 2012; AVIO *et al.*, 2015), por ser um marcador de fácil avaliação.

O objetivo do presente estudo foi realizar o biomonitoramento passivo na Baía de Guanabara, utilizando mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) como bioindicadores e monitorar os níveis de HPAs presentes em amostras de água e nos tecidos moles de mexilhão, a fim de estimar as suas concentrações e possíveis fontes e origens; e ainda aplicar os ensaios de vermelho neutro e micronúcleo como biomarcadores para testar a viabilidade celular. Além disso, objetivou-se comparar a concentração dos compostos pesquisados em circunstâncias sazonais diferentes (período seco e úmido). O intuito foi averiguar se os organismos respondem de forma diferente *in situ*, quanto às particularidades de cada estação, em relação à resposta dos biomarcadores e ao fator de acumulação.

## 2. Metodologia

### 2.1 Amostragem e tratamento das amostras

A área escolhida para estudo é um ambiente estuarino, no qual se situa o aporte da Baía de Guanabara localizada no Rio de Janeiro e engloba toda a

região Metropolitana da cidade. A área de coleta é conhecida como “Quadrado da Urca” (Figura 1), que possui embarcações em excesso e recebe muitos despejos de esgoto, além de derramamentos de óleo, aterramentos oficiais e clandestinos (NAKASHIMA e PRANTERA, 2006). Esta região apresenta períodos chuvosos e secos bem definidos. O inverno corresponde aos meses mais secos, que vão de junho a agosto, com médias mensais de 50 mm. O período úmido corresponde ao verão e apresenta uma média mensal acima de 100 mm (KJERFVE, 1997). A primeira coleta (campanha 1 – C1 – período seco) foi realizada em Julho de 2013 e a segunda (campanha 2 – C2 – período úmido) em Janeiro de 2014, em uma área de costões rochosos. Foram coletados aleatoriamente de 8-10 indivíduos e colocados em saco *ziploc*, contendo água local. Triplicata de amostras de água foram coletadas em garrafas de vidro de 4 L, previamente descontaminadas, e estas foram devidamente acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e armazenadas a 4°C, posteriormente, no laboratório.

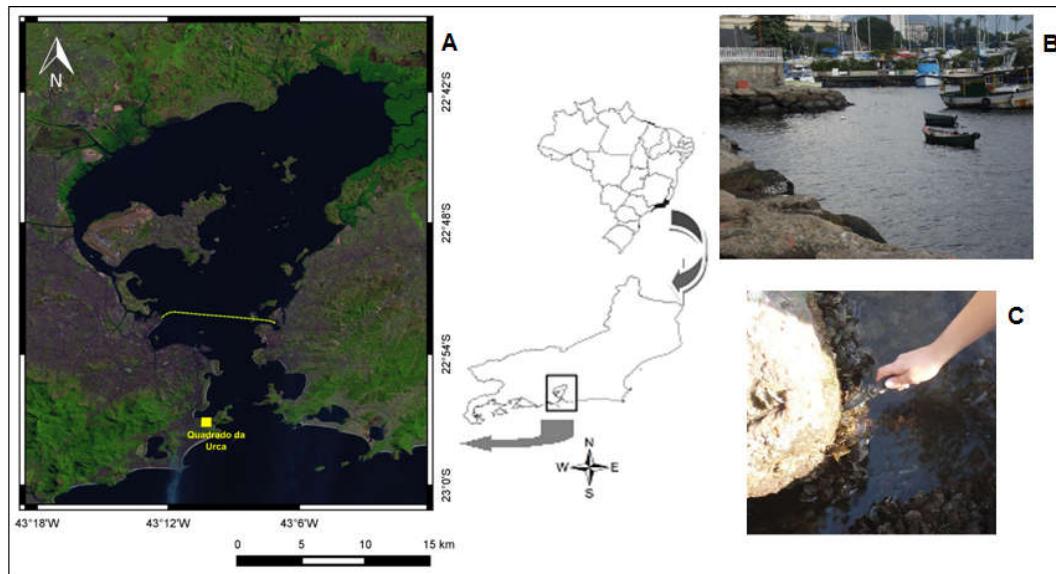


Figura 1 - Quadrado da Urca: A) Indicação do ponto de coleta em amarelo no mapa; B) Características locais; C) Retirada de mexilhões do costão. Fotos: Larissa Nogueira.

No laboratório, foi realizada a biometria dos animais, com auxílio de uma balança e paquímetro (Figura 2A/2B). Os indivíduos amostrados na campanha 1 (C1) tinham um tamanho relativamente pequeno (5,7-7,0 cm e 20,5-35 g), e

então, foram confeccionadas quatro amostras compostas ( $N=4$ ), contendo dois indivíduos cada, para obtenção de massa satisfatória para análise. Na campanha 2 (C2), a análise foi realizada individualmente ( $N=8$ ), por conta da massa suficiente (5,5-7,3 cm e 25,4-53,4 g). A hemolinfa foi extraída com auxílio de uma seringa hipodérmica (1 a 2,5 ml) com agulha 0,8 X 40 mm, contendo 100  $\mu$ L de solução fisiológica. A agulha foi inserida cuidadosamente no músculo adutor posterior do animal e cada amostra obtida foi depositada em um tubo de Eppendorf de 1 mL de volume (Figura 2C).



Figura 2 - Biometria, mensuração de tamanho e peso dos mexilhões, com auxílio de balança (A) e paquímetro (B); Extração de hemolinfa contendo solução salina fisiológica (C). Fotos: Larissa Nogueira.

## 2.2 Teste do Vermelho Neutro

O teste do vermelho neutro seguiu o protocolo modificado de LOWE *et al.* (1995), com preparo de uma solução salina fisiológica (Hepes 20 mM, cloreto de cálcio 10 mM, sulfato de magnésio 53 mM, cloreto de sódio 436 mM e cloreto de potássio 10 mM). O pH foi ajustado para 7,36 com NaOH 1M. Uma solução de estoque do vermelho neutro (20 mg) foi confeccionada em 1 mL de DMSO, e posteriormente acondicionada na geladeira e a solução de trabalho foi preparada, diluindo a solução estoque na solução salina (5% v/v).

Para o teste de vermelho neutro, diluiu-se a hemolinfa em solução fisiológica (1:1, v/v) em tubo Eppendorf. Uma alíquota de 30  $\mu$ L desta mistura e 30  $\mu$ L do corante vermelho neutro foram adicionados nas lâminas, incubando-as posteriormente em uma câmara escura e úmida por 15 minutos. Após este período, foram colocadas as lamínulas e feitas sucessivas visualizações (a cada 30 min) das lâminas no microscópio (40x), anotando-se o tempo de retenção do corante determinando o ponto em que há evidência da perda do corante dos

lisossomos para o citosol. Considera-se que uma amostra saudável normalmente tem um tempo de retenção de 150-180 minutos (DIERICKX e van de VYVER, 1991).

### 2.3 Ensaio do Micronúcleo

Foi adotado o método descrito por DAILIANIS *et al.* (2003) para avaliar a presença de micronúcleo. Alíquotas de 50 µL de hemolinfa foram transferidas para lâminas, previamente tratadas com solução de Poly-L-lysine para adesão dos hemócitos, e posteriormente foram fixadas com solução de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1, v/v) e coradas com solução Giemsa 3%, por 20 min cada. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico com resolução de 1000. Os resultados foram reportados como MN/1000 hemócitos.

### 2.4 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Para a análise dos HPAs em água, o procedimento de extração foi baseado no método EPA 3510C, após a adição de padrão *surrogate* (*p*-terfenild<sub>14</sub>), padrão de controle para avaliar a recuperação (>70%) dos processos de análise. Sucessivas extrações foram realizadas por agitação (150 rpm) por 3 min, recolhendo a fase orgânica. As frações foram separadas por cromatografia em coluna de vidro (30 cm, 1,3 cm d.i.), empacotada com 7 g alumina 2% desativada, 10 g sílica 5% desativada e 1 g sulfato de sódio muflado, e eluídas com hexano (fração alifática descartada) e com hexano:diclorometano (1:1, v/v) (fração aromática recolhida). O padrão interno referente foi adicionado nas amostras, após redução a 1 mL no sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences).

Para análise de HPAs no tecido do mexilhão, a concha foi aberta com auxílio de espátula para não danificar a amostra e a parte mole foi retirada. As amostras foram acondicionadas em potes de vidros descontaminados e congeladas a -80°C. As amostras de tecido foram liofilizadas (ModulyoD da Thermo), e então, submetidas ao processo de extração em sistema de Soxhlet, baseado no método EPA 3540C, com adição do padrão *surrogate* *p*-terfenild<sub>14</sub>. Posteriormente, foram realizadas etapas de *clean up*, para redução do teor de lipídios, que ocorreu em duas etapas: (a) cromatografia em coluna de alumina (30 cm, 2,2 cm d.i.): montagem da coluna com 20 g de alumina 2% desativada e

hexano e eluição da amostra com diclorometano, reduzindo o volume em sistema Turbo Vap II (Caliper Life Sciences); e (b) cromatografia por permeação em gel (GPC LC-10AD Shimadzu CBM): a amostra (2 mL), com solvente previamente trocado para solução de acetona:ciclohexano (3:7, v/v) sob N<sub>2</sub>, foi injetada no sistema, e o extrato foi recolhido a partir de 13 min e 30 s, com tempo total de corrida de 60 min. A otimização dos tempos de corte dos lipídios e os de retenção das amostras foi baseada em uma solução padrão de referência, CLP-027 (NUDI *et al.*, 2007). O volume foi reduzido em evaporador Biotage TurboVap® 500 e o solvente foi trocado para hexano, para posterior fracionamento dos compostos aromáticos em coluna de sílica-gel, seguindo o mesmo procedimento adotado para as amostras de água.

Na fração aromática foi considerada os 16 compostos prioritários, segundo a USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency*): naftaleno (N), acenaftíleno (Acf), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), fluoranteno (Fl), pireno (Pi), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluoranteno (BbFl), benzo(k)fluoranteno (BkFl), benzo(a)pireno (BaPi), indeno(1,2,3-c,d)pireno (I-Pi), dibenzo(a,h)antraceno (DbahA), benzo(ghi)períleno (BghiPe), e os compostos dibenzotiofeno (DBT), períleno (Pe) e benzo(e)pireno (BePi), e os alquilados (C1 a C4 naftalenos, C1 a C3 fluorenos, C1 a C3 dibenzotiofenos, C1 a C4 fenantrenos, C1 e C2 pirenos, e C1 e C2 crisenos), que compõem o somatório dos 38 HPAs ( $\Sigma$ 38 HPAs).

A metodologia utilizada na determinação de hidrocarbonetos aromáticos descrita acima é baseada no método EPA 8270D, com padronização interna, contendo naftaleno-d<sub>8</sub>, acenafteno-d<sub>10</sub>, fenantreno-d<sub>10</sub>, criseno-d<sub>12</sub> e períleno-d<sub>12</sub>. O cromatógrafo a gás utilizado para análise dos HPAs foi o modelo TraceGC (Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas Polaris Q (Thermo).

## 2.5 Análise Estatística

Testes estatísticos paramétricos (teste T-Student) e não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) foram aplicados para avaliar as diferenças entre períodos de amostragem e correlações entre concentrações de HPAs, utilizando o programa STATISTICA® 12.0.

### 3. Resultados e Discussão

As concentrações dos HPAs analisados nas amostras de água e de mexilhão nas campanhas C1 e C2 são reportadas na Tabela 1. A distribuição destes resultados entre as campanhas com valores dos somatórios ( $\sum 16$  HPAs e  $\sum 38$  HPAs) e dos HPAs individuais pode ser visualizada nas figuras 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1 – Concentrações de HPAs em amostra de água e mexilhão nos dois períodos de amostragem

	C1 – Período seco		C2 – Período úmido	
	$\sum 16$ HPAs	$\sum 38$ HPAs	$\sum 16$ HPAs	$\sum 38$ HPAs
<b>Água</b>	$77,3 \pm 20 \text{ ng L}^{-1}$	$139,3 \pm 16 \text{ ng L}^{-1}$	$7,2 \pm 3,0 \text{ ng L}^{-1}$	$11,1 \pm 6,2 \text{ ng L}^{-1}$
<b>Mexilhão</b>	$245 \pm 117 \mu\text{g kg}^{-1}$	$1545 \pm 377 \mu\text{g kg}^{-1}$	$290 \pm 202 \mu\text{g kg}^{-1}$	$1806 \pm 994 \mu\text{g kg}^{-1}$

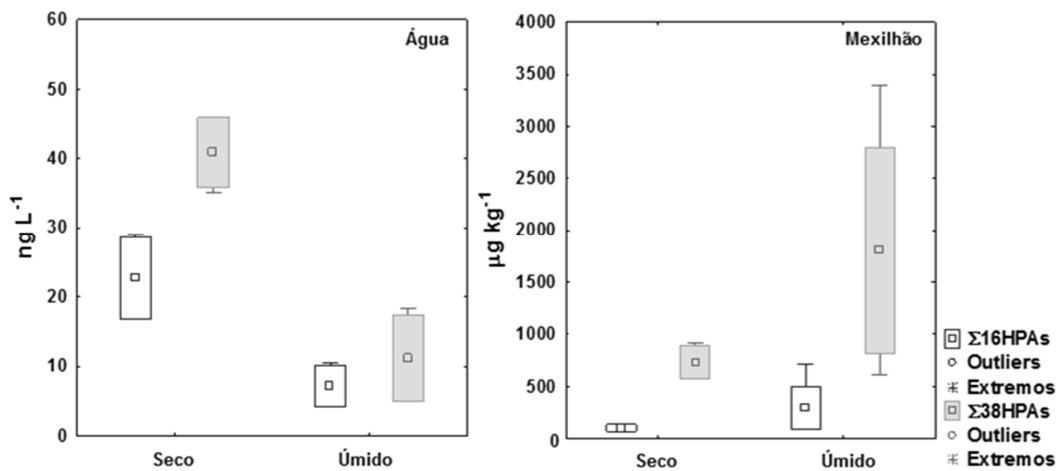


Figura 3 - Boxplot dos níveis de HPAs em amostras de água e de mexilhão nas campanhas C1 (período seco) e C2 (período úmido). Outliers – valores fora do intervalo da média para mais (quartil 3 + 1,5 x interquartil) ou para menos (quartil 1-1,5 x interquartil), ou seja, além do limite interno; Extremos – valores fora do intervalo para mais ( $Q3 + 3 \times IQ$ ) ou para menos ( $Q1 - 3 \times IQ$ ), ou seja, além do limite externo.

No teste de Kruskal-Wallis, observaram-se diferenças estatisticamente significativas apenas nas amostras de água entre as campanhas ( $p=0,04$ ). O teste t também mostrou que as campanhas de água diferem significativamente

entre si tanto para os 16 HPAs ( $p=0,023$ ) quanto para os 38 HPAs ( $p=0,002$ ). Entretanto não mostraram diferenças significativas para os mexilhões ( $p>0,05$ ).

A amostragem de água reflete uma condição momentânea do ambiente estudado e muitas vezes os resultados de mesmos locais apresentam grande variabilidade. Os HPAs determinados em água no presente estudo apresentaram concentrações de hidrocarbonetos na mesma ordem de grandeza reportada por Azevedo (1998) que variaram de 160 a 1480 ng L<sup>-1</sup>. Outros trabalhos realizados na Baía de Guanabara reportaram valores de 870 a 5440 ng L<sup>-1</sup> (UFRJ, 2000; FRANCIONI *et al.*, 2007a).

Os valores analisados em água neste estudo estão abaixo do limite estipulado pelo CONAMA nº 357/2005 (18 ng L<sup>-1</sup>) para HPAs como criseno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno e indeno(1,2,3cd)pireno, bem como pela NOAA para o  $\Sigma$ 16HPAs (300 ng L<sup>-1</sup>) (BUCHMAN, 2008).

HPAs acumulados em mexilhões são similares aos níveis encontrados em estudos anteriores na Baía de Guanabara, sendo a soma média dos HPAs totais de 532 µg kg<sup>-1</sup> a 1410 µg kg<sup>-1</sup> (FRANCIONI *et al.*, 2005, YOSHIMINE *et al.*, 2012). Valores relativamente baixos (82 – 354 µg kg<sup>-1</sup>) foram reportados por FRANCIONI *et al.* (2007a), antes do vazamento do óleo MF380 em janeiro de 2000 na Baía de Guanabara. Um mês após este fato, as concentrações de HPAs em mexilhões chegaram a torno de 1800 µg kg<sup>-1</sup>. FRANCIONI *et al.* (2007b) monitoraram níveis de HPAs totais ( $1072 \pm 1124$  µg kg<sup>-1</sup>) ao longo de 5 anos, sendo os maiores valores ( $2900 \pm 1125$  µg kg<sup>-1</sup>) encontrados após derrames de óleo. Azevedo *et al.* (2004), avaliaram níveis de HPAs sazonalmente, encontrando maiores concentrações no inverno (período seco 173–432 µg kg<sup>-1</sup>) em comparação ao verão (período úmido 68–375 µg kg<sup>-1</sup>).

Mediante a questão de um potencial risco à saúde humana por conta das concentrações de HPAs em mexilhões, não foram encontrados valores-limite contemplados na legislação brasileira. No entanto, alguns países adotam concentrações-limite recomendadas para o consumo humano de acordo com o que foi estabelecido pela convenção de *Oslo and Paris Convention* (OSPAR Comission, 2009), que estipula valores individuais em peso seco para alguns

HPAs que variam de 0,5 µg kg<sup>-1</sup> para antraceno, 10 µg kg<sup>-1</sup> para fluoranteno a 50 µg kg<sup>-1</sup> para benzo(a)pireno.

Órgãos nacionais e internacionais, responsáveis pela regulação ambiental, reconhecem os perigos em potencial da ocorrência dos HPAs no ambiente, uma vez que mais de 30 HPAs e seus derivados apresentam efeitos carcinogênicos (NEFF, 2002). Neste estudo, foram analisados os sete HPAs reportados pela USEPA, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e dibenzo(a,h)antraceno, considerados carcinogênicos ao homem. Os compostos carcinogênicos representam mais que 50% do conteúdo total de HPAs em amostras de mexilhão em ambas as campanhas. Enquanto nas amostras de água a quantidade foi inferior a 50%, sendo maior na campanha 1. Segundo Neff (2002), todos os HPAs carcinogênicos são compostos de alto peso molecular (4-6 anéis), que apesar de não apresentarem intenso efeito tóxico agudo, possuem grande potencial carcinogênico quando comparados aos compostos de baixo peso molecular (2-3 anéis).

Na distribuição das classes de HPAs parentais nas amostras de água e de mexilhão entre as duas campanhas, os níveis de HPAs de alto peso molecular, ou seja, os que contêm de 4 a 6 anéis (fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e benzo(g,h,i)perileno), representaram a maior parte dos HPAs em ambas as matrizes nas campanhas C1 e C2, exceto duas amostras de água (C2), que apresentaram quantidades maiores de HPAs de baixo peso molecular (2 a 3 anéis - naftaleno, acenaftíleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno). Em termos do impacto sobre a saúde dos organismos e do homem como consumidor do mexilhão, a acumulação de HPAs de alto peso molecular e de caráter acentuadamente lipofílico é preocupante, pois estas substâncias são consideradas potencialmente carcinogênicas e mutagênicas (FRANCIONI *et al.*, 2005).

Quando se observa a distribuição espacial (Figura 4) das concentrações dos HPAs individuais, verifica-se que a maioria das amostras de água apresentaram concentrações na faixa de <LQ a 7 ng L<sup>-1</sup>, sendo os maiores

valores observados em amostras coletadas no período seco (C1). Este comportamento se mostrou inverso para os mexilhões, onde os maiores níveis foram detectados na segunda campanha (período úmido). Além disto, ambas as matrizes apresentam compostos alquilados, característicos de ambientes que sofreram aportes petrogênicos, cuja distribuição em forma de rampa, como os alquilados de fluoreno para os mexilhões, indica material degradado. A distribuição em forma de sino, como os alquilados de naftaleno e fenantreno, indica a presença de aporte recente de petróleo (WANG *et al.*, 1999).

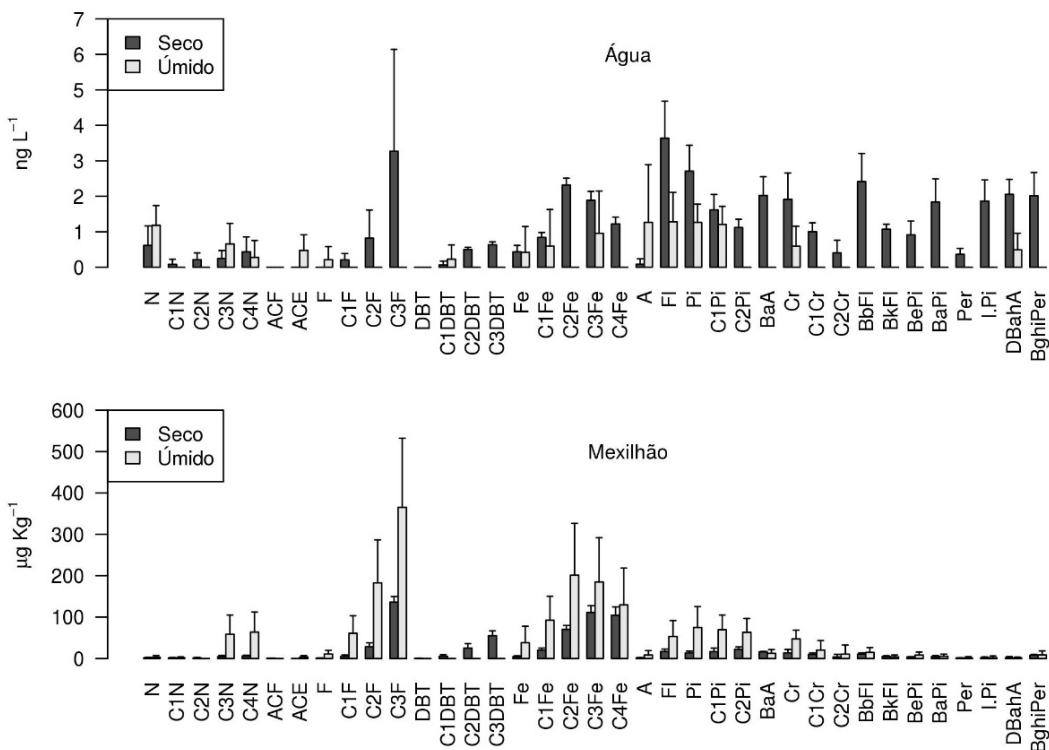


Figura 4 - Distribuição dos compostos individuais nas amostras de água e mexilhões coletados nas campanhas C1 (período seco) e C2 (período úmido).

Para diferenciar HPAs originados em combustão daqueles de origem petrogênica, aplicaram-se algumas razões diagnósticas (Figuras 5 e 6) para diferenciação das mesmas (YUNKER *et al.*, 2002). Observou-se mistura de fontes no Quadrado da Urca, com maior influência de compostos de origem pirolítica, de dois tipos de combustão (madeira e petróleo). Entretanto, amostras de água e mexilhão apresentaram séries alquiladas, como a do dibenzotiofeno

e fenantreno, indicando uma típica degradação de óleo caracterizada com a distribuição C0<C1<C2<C3 (WANG *et al.*, 1999).

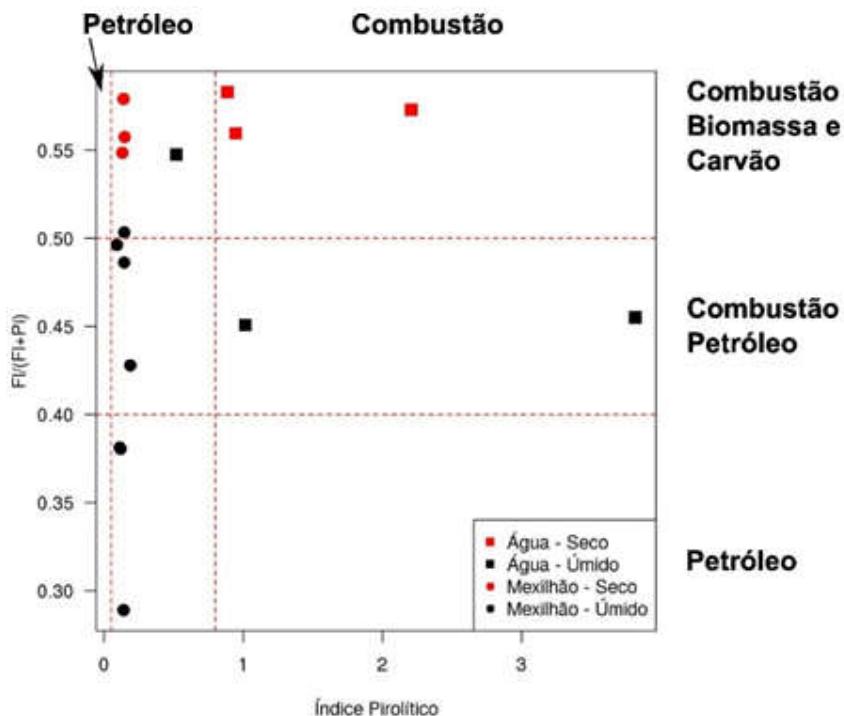


Figura 5 - *Cross-plot* das razões diagnósticas para diferenciação da origem dos HPAs.  $FI/(FI+Pi)$  - Razão entre a concentração de fluoranteno e a soma das concentrações do fluoranteno e pireno; Log índice pirolítico =  $\sum 3-6$  anéis /  $\sum 5Alq$  - Razão entre o somatório dos HPAs de 3 a 6 anéis (acenaftíleno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno) e o somatório das cinco séries dos HPAs alquilados (nafatleno, fenantreno, fluoreno, criseno, dibenzotifeno e seus homólogos alquilados) (WANG *et al.*, 1999).

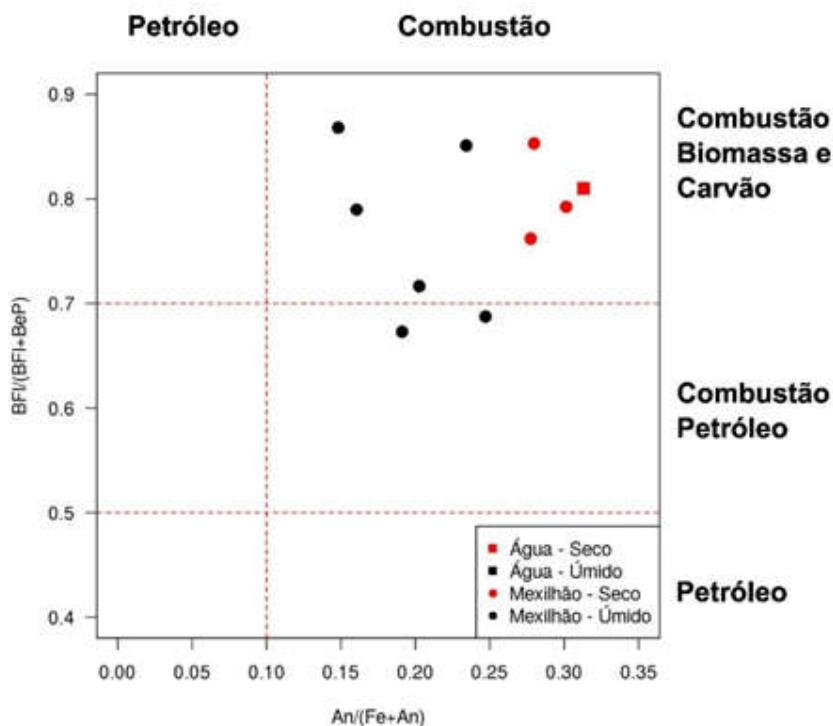


Figura 6 - Cross-plot das razões diagnósticas para diferenciação da origem dos HPAs. BFl/(BFl+BeP) – Razão entre a concentração de benzo(k)fluoranteno e a soma das concentrações de benzo(k)fluoranteno e benzo(e)pireno. An/(Fe+An) - Razão entre a concentração de antraceno e a soma das concentrações de fenantreno e antraceno (YUNKER *et al.*, 2002).

Em relação aos biomarcadores celulares, o ensaio de vermelho neutro (Figura 7A) apresentou um tempo de retenção de 90 minutos na campanha 1 (seco) e 60 minutos na campanha 2 (úmido) e em comparação com estudos realizados também na Baía de Guanabara, mas em outros pontos de coleta (FRANCIONI *et al.*, 2005; 2007a), este ensaio apresentou tempo de retenção entre 25-82 minutos, caracterizando os ambientes como impactados. Estudos na ilha de São Sebastião e em Santos (PEREIRA *et al.*, 2014) e na Baía do Espírito Santo (SOUZA *et al.*, 2011), os tempos de retenção do vermelho neutro variaram entre 27-35 min e 35-115 (área controle) min, respectivamente. Em ambientes semelhantes, em uma célula saudável, o tempo de retenção do vermelho neutro é de 180 minutos para o mexilhão *Perna perna* (FRANCIONI *et al.*, 2005). Portanto, o resultado obtido no presente estudo sugere um comprometimento da integridade lisossômica, retendo o corante vermelho neutro por menos tempo,

espalhando-se pelo citosol, o que demonstra o estresse causado ao organismo utilizado devido à contaminação.

Os resultados do ensaio de micronúcleo na primeira campanha apresentaram baixa frequência. Provavelmente isto ocorreu devido à alta associação das células, que dificultou a contagem dos mesmos. Na segunda campanha, verificou-se a frequência de micronúcleos em 42% das lâminas analisadas (Figura 7B), mas não houve uma clara correlação com as concentrações de HPAs no meio. A possível presença de outros contaminantes no ambiente também deve ser considerada, uma vez que, atuam direta ou indiretamente no DNA colaborando para formação dos MN. O teste de micronúcleo se mostrou adequado quanto à utilização de hemócitos para testar a genotoxicidade de xenobióticos no meio estudado.

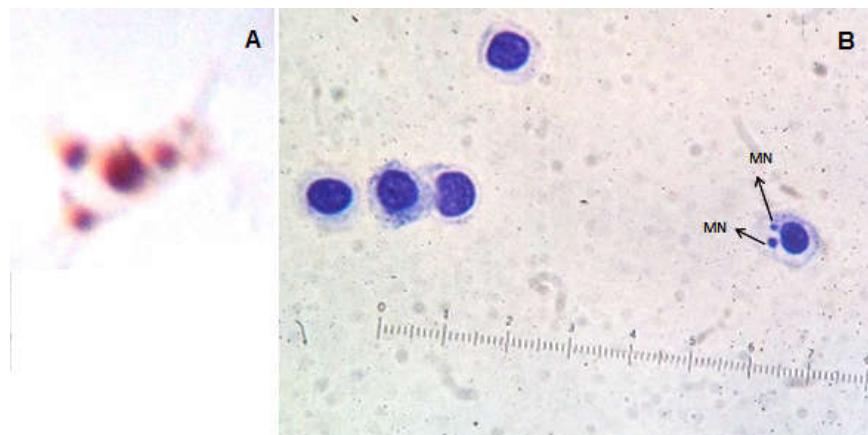


Figura 7 - Vermelho neutro liberado dos lisossomos para o citosol – tempo 90 minutos (A); Hemócitos saudáveis e hemócito com formação de MN (B).

#### 4. Conclusão

Apesar dos níveis de HPAs em água terem sido baixos, foram obtidos um grande sinal destes compostos nos organismos avaliados no mesmo local. O mexilhão *Perna perna* provou ser eficiente como biomonitor de contaminação por HPAs, mostrando diferentes níveis na sazonalidade.

A resposta celular ao estresse, através do ensaio de Vermelho Neutro e Micronúcleo, reflete o efeito dos HPAs e um possível impacto no ambiente. O uso de biomarcadores como o vermelho neutro e micronúcleo, e de mexilhões

*Perna perna* como bioindicador mostrou ser uma importante ferramenta para a avaliação da contaminação ambiental em ambientes estuarinos.

## 5. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e ao Departamento de Química da PUC-Rio.

## 6. Referências

ARALDI, R.P.; MELO, T.C.; MENDES, T.B.; JÚNIOR, P.L.S.; NOZIMA, B.H.N.; ITO, E.T.; CARVALHO, R.F.; SOUZA, E.B.; STOCCO, R.C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 72, p. 74–82, 2015.

AVIO, C.G.; GORBI, S.; MILAN, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; d'ERRICO, G.; PAULETTO, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. **Environmental Pollution**, v. 198, p. 211-222, 2015.

AZEVEDO, L. A. C. **Determinação de hidrocarbonetos em amostras de água e mexilhões da Baía de Guanabara**. Rio de Janeiro, 1998. 106p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998. 106p.

AZEVEDO, L. A.; BRÜNING, I. M. R. de A.; MOREIRA, I. Hydrocarbon contamination in mussels from Guanabara Bay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 1109–1126, 2004.

BUCHMAN, M.F. **NOAA Screening Quick Reference Tables NOAA OR&R Report 08-1**, Seattle WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration. 34p. 2008.

CONAMA Nº 357/2005 - "Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências."- Data da legislação: 17/03/2005 - Publicação DOU: 18/03/2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em Jun 2014.

CORTEZ, F.S.; PEREIRA, C.D.S.; SANTOS, A.R.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; MARTINI, G.A.; BOHRER-MOREL, M.B. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Environmental Pollution**, v. 168, p. 145-150, 2012.

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G.P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 56, p. 443-470, 2003.

DIERICKX, P.J.; van der VYVER, I.E. Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 649-653, 1991.

EPA Method 3510C - **Separatory funnel liquid-liquid extraction**. In: Test method for evaluation solid waste physical/chemical methods. Laboratory manual. Environmental Protection Agency, 8p.1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3510c-separatory-funnel-liquid-liquid-extraction>>, acesso em Mar 2012.

EPA Method 3540C - **Soxhlet extraction**. In: Test method for evaluation solid waste physical/chemical methods. Laboratory manual. Environmental Protection Agency, 8p.1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3540c-soxhlet-extraction>>, acesso em Mar 2012.

EPA Method 8270D - **Gas chromatography/mass spectrometry for semi volatile organics capillary column technique**. Laboratory manual. Environmental Protection Agency, 62p. 1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/homeland-security-research/epa-method-8270d-sw-846-semivolatile-organic-compounds-gas>>, acesso em Mar 2012.

FAN, A.M. Biomarkers in toxicology, risk assessment, and environmental chemical regulations. In: GUPTA, Ramesh C. (ed). **Biomarkers in Toxicology**. Boston: Academic Press, 2014, p. 1059-1080.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A.; SCOFIELD, A.L.; CAVALIER, B. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon in *Perna perna* from Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Forensics**, v. 6, p. 361-370, 2005.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A. de L.R.; SCOFIELD, A. L; DEPLEDGE, M.H.; CAVALIER, B. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 329-338, 2007a.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A. de L.R.; SCOFIELD, A. de L.; DEPLEDGE, M.H.; CAVALIER, B.; SETTE, C.B.; CARVALHOSA, L.; LOZINSKY, C.; MARIATH, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel *Perna perna*: Space-time observations, source investigation and genotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 515–531, 2007b.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C.H.A.; DIAS, G.T.M.; FILIPPO, A.M.; QUARESMA, V.S. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 17, n. 13, p. 1609-1643, 1997.

LOWE, D.M.; SOVERCHIA, C.; MOORE, M.N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. **Aquatic Toxicology**, v. 33, p. 105-112, 1995.

MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Marine Environmental Research**, v. 61, p. 278-304, 2006.

MORAES, R.B.C. Estudos sobre Poluição Marinha: Importância e Perspectivas. In: MORAES, Rosane B.C.; CRAPEZ, Miriam A.C.; PFEIFFER, Wolfgang C.; FARINA, Marcos; BAINY, Afonso C.D.; TEIXEIRA, Valéria L. (orgs.). **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. 1a. ed. São Paulo: Arte & Ciência Villipress, p. 9-12, 2001.

NAKASHIMA, L.S.; PRANTERA, M.T. Estudo da Poluição da Baía de Guanabara. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 86-96, 2006.

NEFF, J.M. **Bioaccumulation in marine organisms** – Effect of contaminants from oil well produced water. Oxford: Elsevier Science Ltda, 2002.

NUDI, A. H.; WAGENER, A. L.; FRANCIONI, E.; SCOFIELD, A. L.; SETTE, C.B.; VEIGA, A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**, v. 33, p. 315-327, 2007.

OSPAR Comission. Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic. **Monitoring and Assessment Series - Background document on CEMP assessment criteria for the QSR 2010** (Publication 461/2009). ISBN 978-1-907390-08-1. 24p.

PAVANELLO, S., LOTTI, M. Biomonitoring exposure to carcinogens. In: GUPTA, Ramesh C. (ed). **Biomarkers in Toxicology**. Boston: Academic Press, 2014, p. 785-798.

PEREIRA, C.D.S., ABESSA, D.M.S., CHOUERI, R.B., ALMAGRO-PASTOR, V., CESAR, A., MARANHO, L.A., MARTÍN-DIAZ, M.A., TORRES, R.J., GUSSO-CHOUERI, P.K., ALMEIDA, J.E., CORTEZ, F.S., MOZETO, A.A., SILBINGER, H.L.N., SOUSA, E.C.P.M., VALLS, T.A.D., BAINY, A.C.D. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 118-126, 2014.

SOUZA, I.C.; SANTANA Jr, P.J.; ALMADA, B.V.P; ZARONI, L.P.; MATSUMOTO, S.T. Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). **Natureza on line**, v. 9, n. 2, p. 54-58, 2011.

UFRJ; UERJ; PUC; UFF; PETROBRAS. **Caracterização preliminar do impacto do vazamento acidental de óleo ocorrido em 18/01/2000 na Baía de Guanabara**. Relatório final, p. 51, 2000.

YOSHIMINE, R.V.; CARREIRA, R.S.; SCOFIELD, A.L.; WAGENER, A.L.R. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels (*Perna perna* Linnaeus 1758). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2581-2587, 2012.

YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, R.H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**, v. 33, p. 489-515, 2002.

WALKER, C.H. **Organic Pollutants**: an Ecotoxicological Perspective. 2a.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

WANG, Z.; FINGAS, M.; PAGE, D.S. Oil spill identification. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 369-411, 1999.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 288, p. 369-376, 2005.