

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS DE
PETRÓLEO EM MEXILHÕES *Mytilus galloprovincialis* DA COSTA SUL DE
PORTUGAL. O SISTEMA MFO COMO BIOMARCADOR DE
CONTAMINAÇÃO**

(Tese definitiva para a obtenção do grau de doutor no Ramo de Ciências e Tecnologias do
Ambiente, Especialidade Ambiente Aquático)

BELISANDRA MARIA MARTINS LOPES

FARO, 2009

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta dissertação desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que ao longo do tempo sempre me apoiaram, encorajaram e criticaram, sem os quais nada teria sido possível. A todos, o meu sincero “Obrigada”.

Professora Doutora Maria João Bebianno pela orientação, interesse e apoio demonstrado ao longo dos anos, cuja leitura crítica e sugestões levaram a termo a redacção desta tese. Pela confiança depositada em mim.

Doutora Cinta Porte Visa (CSIC – Barcelona), pela forma como me recebeu no seu laboratório, no qual aprendi as técnicas analíticas empregues nesta tese. Pela sua orientação e disponibilidade para me auxiliar e aconselhar.

Engenheira Ana Maria Ferreira (IPIMAR - Algés) pela sua experiência e disponibilidade nas análises químicas de GC-MS, pelo interesse e apoio demonstrado ao longo dos anos.

Denise Martins (FERN - UAlg) pelo apoio ao nível das técnicas espectrofotométricas e Luísa Barreira (FCMA - UAlg) pela sua amizade e apoio analítico no HPLC.

Alexandra Cravo pela sua amizade e apoio constante e Maria do Rosário Coelho que apesar de já não trabalháramos directamente, nunca deixou de ser uma amiga .

Aos meus colegas (Ângela Serafim, Rui Company, Alexandra Marques, Luísa Barreira, Denise Fernandes, Cristina Ferreira, Helena Felícia, Filomena Rita, Miguel Madureira e a todos que ao longo do tempo pelo laboratório passaram) pelo ambiente de trabalho e por todos os momentos passados juntos, especialmente nos dias de amostragem, quando o caos dos imprevistos conduz a risos. A todos, um muito obrigada por tudo. Especialmente à Ângela Serafim, cuja amizade de longa data me encorajou a continuar, e ao Rui Company pelas longas horas de gabinete bem passadas.

Silvina Barros, Paula Serafim, Helena Gonçalves, pela amizade, apoio e incentivo.

Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo financiamento concedido.

Um agradecimento muito especial à minha família pelo apoio, compreensão e amor incondicional. À Matilde pelas histórias não lidas ao deitar e ao Luís pela paciência infinita. Por fim, agradeço aos meus pais, o meu porto seguro, a quem tudo devo. A eles dedico esta tese.

NOME: Belisandra Maria Martins Lopes

FACULDADE: Ciências do Mar e Ambiente

ORIENTADOR: Professora Doutora Maria João Bebianno

DATA: 9 de Fevereiro de 2009

TÍTULO DA TESE: Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* da costa Sul de Portugal. O sistema MFO como biomarcador de contaminação.

RESUMO

O crescimento da actividade industrial verificada durante o século passado resultou num rápido aumento da entrada de uma grande variedade de contaminantes orgânicos potencialmente tóxicos no ambiente estuarino e zonas costeiras, tais como os hidrocarbonetos do petróleo. A costa Portuguesa é atravessada por alguns dos principais e mais movimentados Esquemas de Separação de Tráfego (ESTs) de navios de/para o Mediterrâneo, Norte da Europa, África e América, apresentando um risco considerável de poluição marinha. Nesta dissertação, o impacto de hidrocarbonetos do petróleo (fracção alifática e aromática) foi avaliada pelo uso integrado de análises químicas e de respostas bioquímicas específicas, como o citocromo P450 (componente principal do sistema MFO) em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* recolhidos em 8 locais da costa Sul de Portugal. A concentração dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e aromáticos policíclicos (PAHs) avaliada nos mexilhões permite discriminar entre locais com contaminação ambiental elevada a muito elevada (Vilamoura-VM e Olhão-OL) e locais onde a contaminação ambiental apresenta valores considerados de base (Faro-FR e Tavira-TV). A variação sazonal revela concentrações mais elevadas no Outono e Inverno, relativamente à Primavera e ao Verão. Os *n*-alcanos, isoprenoides e PAHs individuais indicam contaminações petrogénicas e pirolíticas, com origem em petróleo/óleo não queimado, combustão incompleta de combustíveis fósseis e combustão de biomassa. A acumulação de hidrocarbonetos nos tecidos dos mexilhões decresce ao longo do tempo, indicando uma redução da influência antropogénica e uma melhoria geral das condições ambientais. A variação sazonal e espacial da concentração de citocromo P450 (CYP450) apresenta o mesmo padrão que o dos hidrocarbonetos, existindo uma relação significativa entre si. Os mexilhões foram transplantados de um local limpo (TV) para um local contaminado (VM), e *vice-versa*. Nos ensaios de

transplante os organismos acumulam hidrocarbonetos de modo diferente, adquirindo os mexilhões características do local para onde foram transplantados. A acumulação de hidrocarbonetos está directamente relacionada com a concentração de CYP450, enfatizando o metabolismo deste tipo de compostos pelo mexilhão *M. galloprovincialis*.

Palavras Chave: hidrocarbonetos do petróleo; sistema MFO; biomarcadores; mexilhões; Sul de Portugal

NAME: Belisandra Maria Martins Lopes

FACULTY: Marine Sciences and Environment

SUPERVISOR: Professora Doutora Maria João Bebianno

DATE: 09/02/2009

TITLE OF THE THESIS: Assessment of petroleum hydrocarbons contamination in mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal. MFO system as biomarker of contamination.

ABSTRACT

The increasing growth of industrial activity during the last century resulted in a fast increase of a great variety of potentially toxic organic contaminants in estuarine environment and coastal zones, such as petroleum hydrocarbons. The Portuguese coast is crossed by main Traffic Separation Schemes (Esquemas de Separação de Tráfego - ESTs) to/from the Mediterranean, North Europe, Africa and America, presenting a considerable risk of pollution. In this thesis, the impact of petroleum hydrocarbons (aliphatic (HAs) and aromatic (PAHs)) was assessed by the integrated use of chemical analyses and specific biomarkers, as cytochrome P450 (main component of mixed function oxygenase system - MFO) in mussels *Mytilus galloprovincialis* collected in 8 sites along the South coast of Portugal. The hydrocarbons concentration (HAs and PAHs) evaluated in mussels discriminate between places with high to very high levels of contamination (VM and OL) to places considered with baseline levels (FR and TV). The seasonal variation shows higher concentrations in Autumn and Winter, relatively to Spring and Summer. Individual concentration of *n*-alkanes, isoprenoids and PAHs indicate petrogenic and pirolitic sources of hydrocarbons, from petroleum/oil, incomplete fossils fuel combustion, and biomass combustion. Contamination throughout time decreases, indicating a reduction in anthropogenic inputs and a general improvement of environmental conditions. Seasonal and spatial variation of CYP450 concentration presents the same pattern of petroleum hydrocarbons, with a significant relation between them, indicating that CYP450 is active in the biotransformation of these compounds. Mussels were transplanted from a clean site (TV) to a more contaminated one (VM) and *vice-versa*. In the transplant assays, mussels accumulated hydrocarbons in different ways, taking the characteristics of the place to where they were transplanted. The hydrocarbons accumulation is directly related to the CYP450

concentration, emphasizing the metabolism of petroleum compounds by mussels *M. galloprovincialis*.

Keywords: petroleum hydrocarbons; MFO system; biomarkers; mussels; South coast of Portugal

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	xxii

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – INTRODUÇÃO	2
1.2 – Composição e características do petróleo	3
1.2.1 - Fontes e origem dos hidrocarbonetos	6
1.2.2 – Destino do óleo derramado	11
1.2.3 – Derrames de petróleo em Portugal.....	17
1.3 – Efeito dos hidrocarbonetos nos organismos.....	22
1.3.1 - Biodisponibilidade e bioacumulação.....	23
1.2.2 – Toxicidade e efeitos sub-letais.....	31
1.2.3 - Metabolismo e biotransformação dos PAHs	32
1.4 – O citocromo P450 e o sistema MFO	36
1.5 – O citocromo P450 como biomarcador de exposição a hidrocarbonetos	40
1.6 - Objectivos	42
2 - MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 – RECOLHA DE AMOSTRAS	52
2.2 - ANÁLISES QUÍMICAS.....	52
2.2.1 - Material de vidro.....	52
2.2.2 - Solventes e adsorventes	53
2.2.3 - Extracção e fraccionamento.....	53
2.2.4 – Análise e quantificação dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs)	55
2.2.5 – Análise e quantificação dos PAHs	57
2.3 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	60
2.3.1– Fraccionamento subcelular.....	60
2.3.2– Sistema Monooxigenase de Função Mista (Sistema MFO).....	61

A - Citocromo P450 (CYP450)	61
B - Citocromo b ₅ (Cit b ₅)	63
C - NADPH citocromo c reductase (NADPH -red).....	64
D - NADH citocromo b ₅ reductase (NADH-red).....	65
2.3.3 – Determinação da concentração de proteínas	65
2.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
3 – DISTRIBUIÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS (HAS) EM MEXILHÕES <i>Mytilus galloprovincialis</i> DA COSTA SUL DE PORTUGAL.....	67
3.1 - INTRODUÇÃO	68
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3.3 - RESULTADOS.....	71
3.3.1- Distribuição Anual.....	71
A - <i>n</i> -alcanos totais e UCM	71
B - <i>n</i> -alcanos individuais e isoprenoides	83
3.3.2 – Distribuição Temporal	99
A - <i>n</i> -alcanos totais e UCM	100
B - <i>n</i> -alcanos individuais e isoprenoides	103
3.4 – DISCUSSÃO.....	108
3.5 - CONCLUSÕES.....	120
4 – DISTRIBUIÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHS) EM MEXILHÕES <i>Mytilus galloprovincialis</i> DA COSTA SUL DE PORTUGAL.....	123
4.1 – INTRODUÇÃO.....	124
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	126
4.3 - RESULTADOS.....	127
4.3.1 - Distribuição Anual.....	127
A - PAHs Totais.....	127
B - PAHs Individuais.....	134
4.3.2 – Distribuição Temporal	153
A - PAHs Totais.....	154
B - PAHs Individuais.....	156
4.4 – DISCUSSÃO.....	165
4.5 – CONCLUSÕES.....	176
5 – O SISTEMA MFO NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO ORGÂNICA EM MEXILHÕES <i>Mytilus galloprovincialis</i> DA COSTA SUL DE PORTUGAL.....	179
5.1 – INTRODUÇÃO.....	180
5.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	181
5.3 - RESULTADOS.....	183
5.3.1 - Distribuição Anual.....	183
A - Citocromo P450 (CYP450)	183
B – Pico 418 (P418).....	187

C – NADPH-citocromo <i>c</i> -reductase (NADPH-red)	187
D - Citocromo b ₅ (Cit b ₅)	191
E – NADH-citocromo b ₅ -reductase (NADH-red).....	195
F - Relação entre os componentes do sistema MFO.....	199
5.3.2- Distribuição Temporal	201
A - Citocromo P450 e NADPH-citocromo <i>c</i> reductase.....	201
B - Citocromo b ₅ e NADH-citocromo b ₅ reductase.....	203
C - Relação entre os componentes do sistema MFO	206
5.3.3- Relação entre o CYP450 e os hidrocarbonetos.....	208
5.4 – DISCUSSÃO	213
5.5 – CONCLUSÕES	223
6 - RESPOSTA DO SISTEMA DEPENDENTE DO CYP450 À VARIAÇÃO DOS TEORES EM HIDROCARBONETOS EM MEXILHÕES <i>Mytilus galloprovincialis</i> TRANSPLANTADOS NA COSTA SUL DE PORTUGAL	225
6.1 – INTRODUÇÃO.....	226
6.2 - MATERIAL E MÉTODOS	227
6.3 – RESULTADOS	229
6.3.1 – Hidrocarbonetos Alifáticos	229
6.3.2 – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	239
6.3.3 – Sistema MFO	252
6.3.4 – Relação entre o CYP450 e os hidrocarbonetos	256
6.4 - DISCUSSÃO.....	260
TAlc e UCM.....	260
PAHs	263
Sistema MFO	267
6.5 – CONCLUSÕES.....	269
7 – DISCUSSÃO FINAL	271
7.1 - CONCLUSÕES.....	282
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	285
ANEXO	319

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 - Exemplos da estrutura química de alguns componentes do petróleo (Adaptado de GESAMP, 1993).	4
Figura 1.2 - Fontes de hidrocarbonetos no ambiente. (1 - combustão incompleta de combustíveis fósseis; 2 - incêndios florestais; 3 - efluentes industriais; 4 - efluentes urbanos; 5 - transporte fluvial proveniente de áreas interiores; 6 - transporte petrolífero (acidentes e rotinas); 7 - deposição de resíduos no mar; 8 - plataformas petrolíferas (acidentes e rotinas); 9 - infiltrações de depósitos marinhos naturais; 10 - diagénese de compostos orgânicos nos sedimentos) (Adaptado de McElroy <i>et al.</i> , 1989)	8
Figura 1.3 - Comportamento do petróleo após derrame no mar e principais processos envolvidos (Adaptado de Fernandes, 2001).	12
Figura 1.4 - Períodos de tempo envolvidos nos processos de degradação dos óleos (Adaptado de Clark, 2001).	14
Figura 1.5 - Corredores de navegação da ZEE Portuguesa (CNADS, 2001).	17
Figura 1.6 - Acidentes ocorridos no mar territorial e ZEE do Continente entre 1971 e 2002 (Monteiro e Gouveia, 2005).	19
Figura 1.7 - Número (A) e distribuição (B) dos pontos descarga de hidrocarbonetos na ZEE sob jurisdição do Departamento Marítimo do Sul, entre 1990 e 2003 (CCDRA, 2004).	19
Figura 1.8 - Principais vias de biotransformação, desintoxicação e toxicidade, e os resultantes efeitos moleculares, dos compostos orgânicos xenobióticos nos animais (as setas a tracejado representam os efeitos moleculares tóxicos) (Adaptado de Livingstone, 1991a).	33
Figura 1.9 - Reacções de biotransformação do benzo(a)pireno. (Adaptado de Barreira, 2006). (1 – benzo(a)pireno (B(a)P); 2 – (+)BaP-7,8 epóxido; 3 – (-)trans-BaP-7,8 diol; 4 – (+)anti-BaP-7,8 dihidrodiol-9,10 epóxido; 5 – conjugação com a glutatona).	35
Figura 1.10 - Ciclo catalítico das reacções de monooxidação de um xenobiótico RH, com produto de reacção ROH, mediado pelo CYP450. Na 1ª etapa há a ligação do substrato com Fe oxidado do centro catalítico do cit P450 que altera o potencial redox e permite a transferência de electrões pela NADPH cit c reductase, reduzindo o Fe^{3+} a Fe^{2+} (2). Na 3ª etapa há a ligação do oxigénio molecular a outro ponto adjacente Fe. O complexo não é estável e facilmente autooxidável libertando o radical O_2^- . A reacção continua com a transferência do segundo electrão (4). O O_2^- reage com protões do meio envolvente para formar H_2O a qual é libertada deixando uma forma de oxigénio activa (5) que pode reagir com o substrato (6) resultando numa forma hidroxilada do substrato (7). (Adaptado de Di Giulio <i>et al.</i> , 1995).	36
Figura 1.11 - Transporte de electrões para o CYP450, mediado pela NADPH-citocromo P450 reductase.	38

Figura 1.12 - Vias de transporte de electrões para o CYP450, no retículo endoplasmático. (Adaptado de Porter, 2002). 39

Capítulo 2

Figura 2.1 – Locais de amostragem de *M. galloprovincialis* na costa Sul de Portugal.. 52

Figura 2.2 – Cromatograma do padrão de *n*-alcanos 56

Figura 2.3 - Cromatograma do padrão de PAHs59

Capítulo 3

Figura 3.1 – Variação espacial da concentração total de *n*-alcanos (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano, na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 73

Figura 3.2 - Variação sazonal da concentração total de *n*-alcanos (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 75

Figura 3.3 – Perfis cromatográficos da fracção dos hidrocarbonetos saturados, obtido com coluna capilar. Os números indicam os *n*-alcanos; UCM: “unresolved complex mixture”. Os dados estão representados na mesma escala vertical e horizontal (com pormenor no dobro da escala vertical). 1: Faro Primavera; 2: Sagres Verão; 3: Olhão Inverno I; 4a e 4b: Vilamoura Inverno II) 76

Figura 3.4 - Variação espacial de UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 77

Figura 3.5 - Variação sazonal da UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 79

Figura 3.6 – Análise dos componentes principais (PCA) da concentração de TAlc, UCM e razão UCM/TAlc, nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante o estudo anual, indicando os *loadings* legendados por meses (cores) e por locais (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António). 82

Figura 3.7 – Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos *n*-alcanos e dos isoprenoides nos mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, ao longo de um ano, indicando os *loadings* (compostos) no Eixo 1 e 2. 96

Figura 3.8 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual de *n*-alcanos e isoprenoides, nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal ao longo de um ano, indicando os *scores* (locais) legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António). 98

Figura 3.9 - Concentração total de *n*-alcanos e UCM (média ± desvio padrão) (µg/g ph), em mexilhões *M. galloprovincialis* ao longo da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test $p < 0,05$). 101

Figura 3.10 - Análise de componentes principais (PCA) da concentração total de *n*-alcanos, UCM e razão UCM/TAlc em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante a distribuição temporal. (○ - Inverno I; ● - Inverno II; ● - Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António). 103

Figura 3.11 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos *n*-alcanos e de isoprenoides em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, durante os três Invernos, indicando os *loadings* no Eixo 1 e 2. 107

Figura 3.12 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual de *n*-alcanos e isoprenoides, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, durante três Invernos. (○ - Inverno I; ● - Inverno II; ● - Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António). 108

Capítulo 4

Figura 4.1 - Variação espacial da concentração total de PAHs (média ± desvio padrão) (ng/g ph) em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes meses, ao longo da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 128

Figura 4.2 - Variação sazonal da concentração total de PAHs (média ± desvio padrão) (ng/g ph) em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 130

Figura 4.3 - Padrão de distribuição dos PAHs, agrupados por número de anéis aromáticos, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. 132

Figura 4.4 - Variação sazonal (A) e espacial (B) do teor em lípidos (% do peso fresco) nos tecidos moles dos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da costa Sul de Portugal (média ± desvio padrão) (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$). 133

Figura 4.5 - Relação entre a concentração total de PAHs e o teor em lípidos nos tecidos moles dos mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , considerando todo o conjunto de dados ($n=40$).	134
Figura 4.6 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos PAHs, nos mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , indicando os <i>loadings</i> no Eixo 1 e Eixo 2. (Abreviaturas dos PAHs indicadas na Tabela. 4.1 e seguintes).....	143
Figura 4.7 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração de PAHs, nos mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , indicando os <i>scores</i> legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).	145
Figura 4.8 - Representação gráfica da razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir), durante o período anual. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).	147
Figura 4.9 – Representação gráfica das razões Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer em relação à razão Flu/Flu+Pir, calculadas para os mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , da costa Sul de Portugal. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - VRSA).	149
Figura 4.10 - Análise PLS das assinaturas de PAHs aplicada aos tecidos moles de <i>M. galloprovincialis</i> .(Abreviaturas das assinaturas como na Tabela A2, Anexo)	151
Figura 4.11- Concentração total de PAHs (ng/g ph) em mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal.....	154
Figura 4.12 - Distribuição de PAHs agrupados por número de anéis aromáticos, nos tecidos de <i>M. galloprovincialis</i> , ao longo da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal.....	155
Figura 4.13 – Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração de PAHs, nos mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , indicando os <i>loadings</i> (A), e os <i>scores</i> (B). (○-: Inverno I; ●-: Inverno II; ●- : Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).....	159
Figura 4.14 - Razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir), durante o estudo temporal.	160
Figura 4.15 - Razões Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer em relação à razão Flu/Flu+Pir, calculadas para os mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> , durante o estudo temporal. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - VRSA).	162
Figura 4.16 - Análise PLS das assinaturas de PAHs aplicada aos tecidos moles de <i>M. galloprovincialis</i> , durante o estudo temporal. (Abreviaturas das assinaturas como na Tabela. A2, Anexo).....	164

Capítulo 5

Figura 5.1 - Variação espacial da concentração total de citocromo P450 (pmol/mg prot) (barras brancas) e P418 (ua/mg prot) (barras cinza) (média ± desvio padrão) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 184

Figura 5.2 - Variação sazonal da concentração total de citocromo P450 (pmol/mg prot) (barras brancas) e “P418” (ua/mg prot) (barras cinza) (média ± desvio padrão) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 186

Figura 5.3 – Variação espacial da actividade da NADPH-cit *c*-reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 188

Figura 5.4 –Variação sazonal da actividade da NADPH cit *c* reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 190

Figura 5.5 – Variação espacial da concentração total de citocromo b_5 (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes meses ao longo da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 192

Figura 5.6 – Variação sazonal da concentração de citocromo b_5 (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 194

Figura 5.7 – Variação espacial da actividade da enzima NADH citocromo b_5 reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 195

Figura 5.8 – Variação sazonal da actividade da enzima NADH citocromo b_5 reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)..... 197

Figura 5.9 - Análise de Componentes Principais (PCA) do sistema MFO (vectores) na glândula digestiva dos mexilhões *M. galloprovincialis*, indicando os *scores* legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - SG; 2 - Lagos; 3 – Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António)..... 199

Figura 5.10 – Relação entre o CYP450 e a NADPH-red (A), o pico “418” (B) e o Cit b₅ (C) e entre o citocromo b₅ e a NADH-red (D), considerando todo o conjunto de dados (período anual)..... 200

Figura 5.11 - Variação da concentração total de CYP450 (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot) e da actividade da NADPH-cit c-reductase (nmol/min/mg prot) em três situações de Inverno, na glândula digestiva de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da Costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas $p<0,05$)..... 202

Figura 5.12 - Variação da concentração total de citocromo b₅ (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot), e da actividade da NADH-citocromo b₅-reductase (nmol/min/mg prot) em três situações de Inverno, na glândula digestiva de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da Costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas, $p<0,05$). 204

Figura 5.13 – Análise dos componentes principais (PCA) dos componentes do sistema MFO (vectores) na glândula digestiva dos mexilhões *M. galloprovincialis*, no período temporal, indicando os *scores* legendados por mês e local. (o-: Inverno I; •-Inverno II; ●-Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 – Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António). 206

Figura 5.14 – Relação entre o CYP450 e a NADPH-red (A), o pico “418” (B) e o Cit b₅ (C) e entre o citocromo b₅ e a NADH-red (D), considerando os dados dos três Invernos (período temporal)..... 207

Figura 5.15 – Relação entre a concentração total de CYP450 e a concentração de TPAH, considerando todo o conjunto de dados (A) e mensalmente (B) (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; ●-: Inverno III)..... 210

Figura 5.16 – Análise Canónica (CA) entre os componentes do sistema MFO e a concentração de TAlc (A), de TPAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando todos os meses em estudo. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 3.2 e 4.1). 212

Capítulo 6

Figura 6.1 - Concentração de *n*-alcanos totais TAlc (A) e de UCM (B), nos tecidos moles de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; B – depuração; C – controlo; média ± desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan’s test, $p<0,05$)..... 230

Figura 6.2 - Distribuição da concentração individual de *n*-alcanos (ng/g ph), em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura. 234

Figura 6.3 – Distribuição da concentração individual de *n*-alcanos (ng/g ph), em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira. 236

Figura 6.4 - Análise canónica de correspondência (CCA) dos *n*-alcanos e isoprenoides em relação às razões de diagnóstico, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V). 238

Figura 6.5 - Concentração total de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (TPAH) (ng/g ph) em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; B – depuração; C – controlo; média ± desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan’s test, $p < 0,05$).....	240
Figura 6.6 – TPAH agrupados por anéis (%), em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (A) e de Vilamoura para Tavira (B). (A – acumulação; D – depuração; C – controlo).....	243
Figura 6.7 - Distribuição da concentração individual de PAHs, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (Abreviaturas dos compostos como na Tab. 6.1).	245
Figura 6.8 - Distribuição da concentração individual de PAHs, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira (Abreviaturas dos compostos como na Tab. 6.2).	246
Figura 6.9 - Análise canónica de correspondência (CCA) dos PAHs individuais em relação ao número de anéis, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V). (abreviaturas dos PAH como nas Tabelas 6.3 e 6.4)	247
Figura 6.10 - Razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir) em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (branco) e de Vilamoura para Tavira (preto).....	249
Figura 6.11 - Razões entre Ant/Ant+Fen, BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer em relação à razão Flu/Flu+Pir em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (branco) e de Vilamoura para Tavira (preto).	250
Figura 6.12 - Concentração total de citocromo P450 (A), de P418 (B), e actividade da NADPH-RED (C), concentração de citocromo b ₅ (D), e actividade da NADH-RED (E), na fracção microsomal da glândula digestiva de <i>Mytilus galloprovincialis</i> transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; B – depuração; C – controlo; média ± desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan’s test, $p < 0,05$).	253
Figura 6.13 - Análise dos componentes principais (PCA) dos componentes do sistema MFO na glândula digestiva de mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V).	255
Figura 6.14 - Relação entre a concentração de CYP450 e a concentração de TPAH, nos dois transplantes (A), no transplante de Tavira para Vilamoura (B) e no transplante inverso (C).	256
Figura 6.15 - Análise canónica de correspondência (CCA) entre os componentes do sistema MFO e as concentrações individuais de hidrocarbonetos <i>n</i> -alcanos (A), PAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando ambos os transplantes. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 6.1 e 6.3).	258

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 – Quantidade anual de hidrocarbonetos de petróleo que se estima entrar no meio marinho (Adaptado de Clark, 2001).....	12
Tabela 1.2 - Principais derrames de petróleo ocorridos em Portugal, e noutros locais..	20
Tabela 1.3 - Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (TAlc e UCM) e razões de diagnóstico, em várias espécies e locais do mundo.....	28
Tabela 1.4 – Concentração de PAHs em várias espécies de moluscos e locais do mundo.	29
Tabela 1.5 – Concentração e actividades dos componentes do sistema MFO e actividade da BPH (benzo(a)pireno hidroxilase) em várias espécies.	43

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Limites de detecção dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e aromáticos policíclicos (PAHs) analisados.....	57
Tabela 2.2 -Comparação da concentração de PAHs obtidos no material de referência SRM 2977 (NIST) com as certificadas, e respectivas taxas de recuperação.....	59

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Concentração de TAlc e UCM (média ± desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) e razão UCM/TAlc, em mexilhões <i>M. galloprovincialis</i> recolhidos em diferentes locais da Costa Sul de Portugal, durante um ano.	72
Tabela 3.2 - Concentração individual dos hidrocarbonetos <i>n</i> -alcanos e isoprenoides (média \pm dp)(ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões <i>Mytilus galloprovincialis</i> , recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal, no Inverno I	84
Tabela 3.3 - Concentração individual dos hidrocarbonetos <i>n</i> -alcanos e isoprenoides (média \pm dp)(ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões <i>Mytilus galloprovincialis</i> , recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal na Primavera	85
Tabela 3.4 - Concentração individual dos hidrocarbonetos <i>n</i> -alcanos e isoprenoides (média \pm dp)(ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões <i>Mytilus galloprovincialis</i> , recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no Verão . 86	
Tabela 3.5 - Concentração individual dos hidrocarbonetos <i>n</i> -alcanos e isoprenoides (média \pm dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões <i>Mytilus galloprovincialis</i> , recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no Outono	877

Tabela 3.6 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp)(ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno II**. 88

Tabela 3.7 - Concentração de TAlc, UCM (média ± desvio padrão) (µg/g ph) e razão UCM/TAlc, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da Costa Sul de Portugal, durante o **Inverno III**. 100

Tabela 3.8 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno III**. 104

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Concentração individual de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno I**. 135

Tabela 4.2 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal na **Primavera**. 136

Tabela 4.3 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Verão**. 137

Tabela 4.4 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Outono**. 138

Tabela 4.5 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno II**. 139

Tabela 4.6 - Razões de diagnóstico para diferentes fontes de PAHs. 146

Tabela 4.7 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno III**. 157

Capítulo 5

Tabela 5.1 - Relação entre a concentração total de CYP450 e a actividade da NADPH-cit *c*-reductase, e entre a concentração total de Cit *b*₅ e a actividade da NADH-citocromo *b*₅-reductase na glândula digestiva de *M. galloprovincialis*, por estação do ano (*: *p*<0,05) 201

Tabela 5.2 - Relação entre a concentração total de CYP450 e a actividade da NADPH-cit *c*-reductase, e entre a concentração total de Cit b₅ e a actividade da NADH-citocromo b₅-reductase na glândula digestiva de *M. galloprovincialis*, no Inverno I, II e III (*: $p < 0,05$). 207

Tabela 5.3 – Relação entre a concentração total de CYP450 e a concentração total de TAlc e UCM, em mexilhões *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal. 209

Capítulo 6

Tabela 6.1 - Concentração individual dos *n*-alcanos e isoprenoides (ng/g ph), da UCM e TAlc (µg/g ph) e razões diagnóstico calculadas, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura. 232

Tabela 6.2 - Concentração individual dos *n*-alcanos e isoprenoides (ng/g ph), da UCM e TAlc (µg/g ph) e razões diagnóstico calculadas, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira..... 233

Tabela 6.3 - Concentração individual e total dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ng/g ph), razões de diagnóstico e grupo de anéis, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura..... 241

Tabela 6.4 - Concentração individual e total dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ng/g ph), razões de diagnóstico e grupo de anéis, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira..... 242

Tabela 6.5 - Concentração e actividade dos componentes do sistema MFO, nos ensaios de transplante..... 254

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

Acften	Acenafteno
Acftil	Acenaftileno
Ant	Antraceno
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BkF	Benzo(k)fluoranteno
BPer	Benzo[g,h,i]perileno
BPH	Benzo(a)pireno hidroxilase
BSA	Serum de albumina de bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
C14	<i>n</i> -tetradecano
C15	<i>n</i> -pentadecano
C16	<i>n</i> -hexadecano
C17	<i>n</i> -heptadecano
C18	<i>n</i> -octadecano
C19	<i>n</i> -nonadecano
C20	<i>n</i> -eicosano
C21	<i>n</i> -heneicosano
C22	<i>n</i> -docosano
C23	<i>n</i> -tricosano
C24	<i>n</i> -tetracosano
C25	<i>n</i> -pentacosano
C26	<i>n</i> -hexacosano
C27	<i>n</i> -heptacosano
C28	<i>n</i> -octacosano
C29	<i>n</i> -nonacosano
C30	<i>n</i> -triacontano
C31	<i>n</i> -hentriacontano
C32	<i>n</i> -dotriacontano
C33	<i>n</i> -tritriacontano
C34	<i>n</i> -tetratríacontano
C35	<i>n</i> -pentatriacontano
C36	<i>n</i> -hexatriacontano
CA	Análise Canónica
CCA	Análise Canónica de Correspondência (<i>Canonical Correspondence Analyses</i>)
CCDRA	Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve
CILPAN	Centro Internacional de Luta Contra a Poluição do Atlântico Norte
CNADS	Conselho Nacional do Ambiente e do Desenvolvimento Sustentável
Cris	Criseno
CYP450	Citocromo P450 (<i>Cytochrome P450</i>)
DahA	Dibenzo(a,h)antraceno
DGA	Direcção Geral do Ambiente
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EST	Esquema de Separação de Tráfego
EROD	7 – Ethoxyresofurin <i>O</i> -Deethylase
Fen	Fenantreno
FID	Detector de Ionização por chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
Fit	Fitano
Flr	Fluoreno
Flu	Fluoranteno
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)

HAs	Hidrocarbonetos alifáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Precisão (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IndP	Indeno(123-c,d)pireno
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
MFO	Sistema oxigenase de função mista (<i>Mixed Function Oxygenase System</i>)
N	Naftaleno
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
OSPAR	Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PCA	Análise dos componentes principais (<i>Principal Components Analyses</i>)
PCBs	Bifenis policlorados (<i>Polychlorinated Biphenyls</i>)
Pir	Pireno
PLS	Análise dos quadrados mínimos parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
Pris	Pristano
SRM	<i>Standard Reference Material</i>
TBT	Tributilestanho
TPAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos totais (<i>Total Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UCM	Mistura complexa não resolvida (<i>Unresolved Complex Mixture</i>)
UNEP	United Nations Environmental Programme
US EPA	Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América (<i>Environmental Protection Agency</i>)
UV	Radiação ultravioleta
ZEE	Zona Económica Exclusiva

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – INTRODUÇÃO

O crescimento da actividade industrial verificada durante o século passado fez com que a contaminação ambiental fosse inevitável pois resultou num rápido aumento de produtos e das suas quantidades no ambiente. Por seu lado, a contaminação surge como um sério problema ambiental, e conseqüente ameaça para a saúde das pessoas e dos ecossistemas. Estima-se que mais de 6 milhões de compostos tenham sido criados durante toda a história humana, a grande maioria no século passado. Na actualidade e segundo a OCDE, cada ano adicionam-se cerca de 1500 novos compostos aos 100.000 em uso (Sheehan, 1994). O destino final destes compostos dependerá das suas características físico-químicas, como a pressão de vapor, a solubilidade, a lipoficidade, a resistência à degradação, etc, e às características do meio, como a temperatura, o pH, a matéria orgânica dissolvida e particulada, etc. Um grande número de contaminantes ou xenobióticos, são hidrófobos e por isso são rapidamente associados ao sedimento e acumulados nos tecidos dos organismos em concentrações significativamente acima dos níveis ambientais. Alguns destes contaminantes podem ainda estar presentes no ambiente em níveis considerados tóxicos, podendo induzir efeitos biológicos adversos (Livingstone e Pipe, 1992; Widdows e Dokin, 1992). Por esta razão a avaliação da qualidade ambiental é de vital importância para detectar onde ocorre a contaminação, que contaminantes estão implicados, as suas fontes e avaliar os seus efeitos nos seres vivos (Cajaraville *et al.*, 2000).

Tais contaminantes incluem hidrocarbonetos do petróleo, principalmente hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), metais, compostos bifenil poli-clorados (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos, tributilestanho (TBT), compostos organofosforados e ésteres de ftalato. A acumulação destes compostos nos organismos marinhos pode ocorrer através da

coluna de água, do sedimento ou da alimentação, aumentando com o aumento da biodisponibilidade, da razão lipoficidade/hidrofobicidade e da concentração externa do composto (Gilewicz, *et al.*, 1984; Widdows e Donkin, 1992; Bouloubassi e Saliot, 1993; Livingstone, 1993; Livingstone *et al.*, 1994; Guzzella e Paolis, 1994).

Nesta dissertação será estudada a contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo (HAs e PAHs) e os seus efeitos no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, na costa Sul de Portugal.

1.2 – Composição e características do petróleo

O petróleo (também chamado crude ou óleo), produto da transformação de matéria orgânica vegetal e animal (frequentemente marinha), é uma mistura de compostos orgânicos, sendo considerado uma das substâncias que apresenta maior complexidade na sua composição. Nos produtos do petróleo predominam os hidrocarbonetos (75%), contendo também asfaltenos, enxofre, oxigénio e azoto, em proporções que variam com a origem do petróleo. O níquel e o vanádio estão frequentemente presentes em concentrações na ordem das microgramas por grama, utilizando-se a razão entre estes dois elementos para a caracterização da origem do petróleo (GESAMP, 1993). A Figura 1.1 mostra os principais constituintes do petróleo. Os *n*-alcanos são hidrocarbonetos estáveis e saturados que apresentam ligações C-C simples, com a estrutura tipo C_nH_{2n+2} . São também conhecidos por parafinas, sendo o principal constituinte do petróleo. Nos produtos refinados ocorrem também alcenos que são derivados dos alcanos (nos processos de craque), onde há perdas de átomos de hidrogénio para dar lugar a pelo

menos uma ligação dupla entre átomos de carbono, com a seguinte fórmula geral:

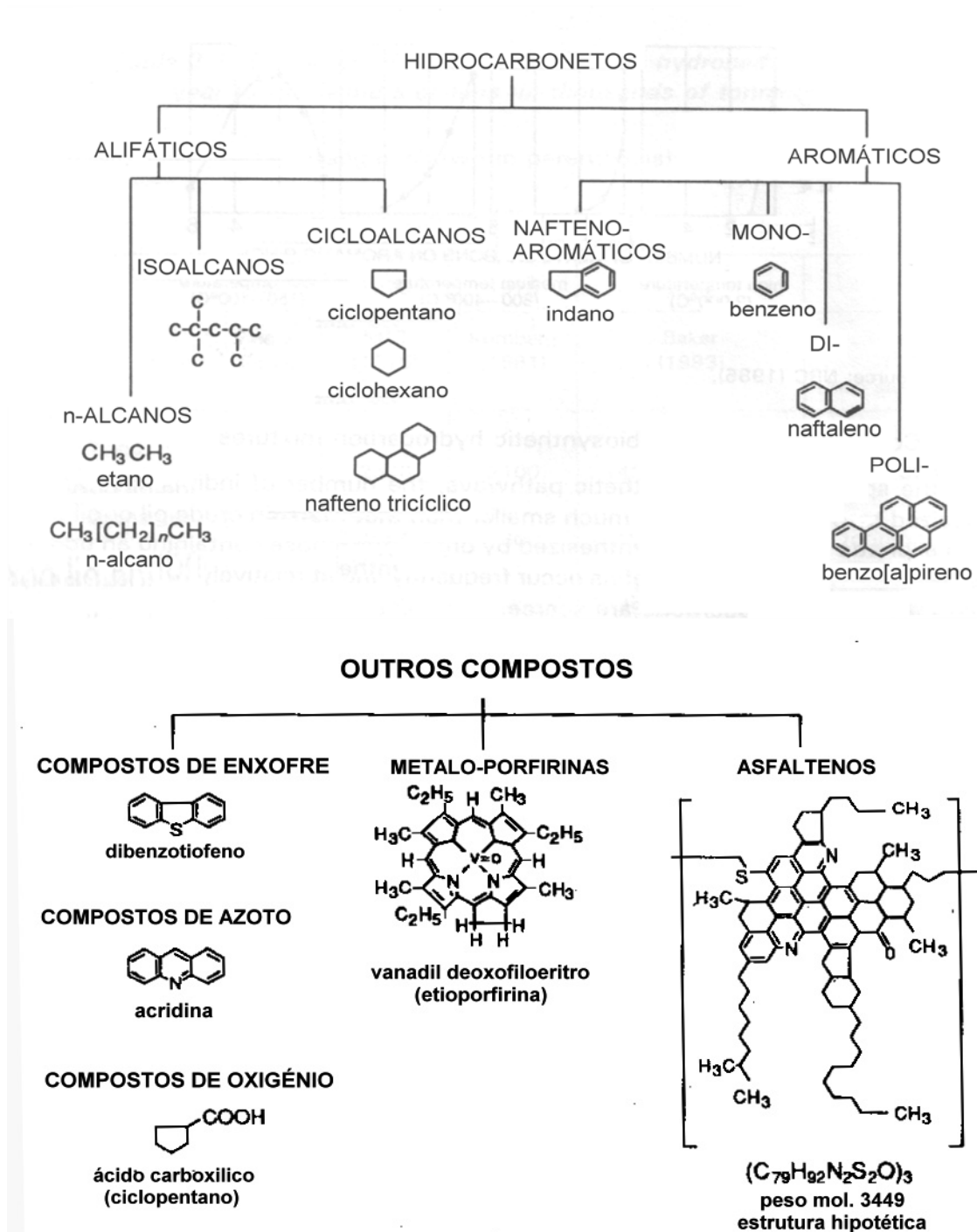


Figura 1.1 - Exemplos da estrutura química de alguns componentes do petróleo (Adaptado de GESAMP, 1993).

Os naftenos são também compostos orgânicos saturados, contudo apresentam terminais ligados numa estrutura anelar, sendo a sua fórmula geral: C_nH_{2n} . São insolúveis na água. Os hidrocarbonetos saturados (tanto os alcanos como os naftenos) de menor peso molecular ($<C_{18}$) são os componentes mais passíveis de dispersão dos óleos, enquanto que as moléculas saturadas maiores (ceras) podem provocar anomalias nos processos de evaporação, dispersão e emulsificação. Os asfaltenos são compostos com elevado peso molecular e definição imprecisa. Contêm S, N e O, podendo também estar associados a metais como o Ni, Cd e V. Não sofrem evaporação, degradação ou dispersão significativa, contribuindo para a formação de emulsões água-óleo estáveis quando em percentagens superiores a 3%. Formam as chamadas bolas de alcatrão (tar balls).

Os compostos orgânicos aromáticos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel benzénico na sua estrutura. Os aromáticos de baixo peso molecular (um ou dois anéis) são solúveis na água, sendo também rapidamente evaporáveis, ao contrário dos PAHs de maior peso molecular. Os aromáticos de baixo ponto de ebulição são responsáveis pela toxicidade da maior parte dos óleos, sendo os aromáticos de elevado ponto de ebulição suspeitos de provocarem cancro e de serem venenos persistentes. O benzeno, tolueno (ou metilbenzeno), etilbenzeno, xilenos (dimetilbenzeno) (BTEX) e benzenos substituídos são os compostos aromáticos voláteis mais comuns no petróleo. O petróleo tem ainda maior proporção de PAHs alquilados relativamente aos PAHs parentais, sendo predominantes os de baixo peso molecular (2 e 3 anéis) do que os de elevado peso molecular (5 e 6 anéis). Assume-se ainda que a concentração de PAHs petrogénicos de 2-4 anéis no crude é de 1.3 $\mu\text{g/g}$ em óleos leves e até 20% nos óleos pesados. Os PAHs são a fracção mais móvel e solúvel dos produtos petrolíferos, e como tal, frequentemente penetram no solo, sedimentos e águas superficiais devido a acidentes. Estes compostos são pró-carcinogénicos e neurotóxicos, sendo os principais

poluentes resultantes de derrames de produtos petrolíferos. Os PAHs com 4 ou mais anéis de benzeno têm propriedades mutagénicas e/ou cancerígenas (Di Giulio *et al.*, 2005).

Os diferentes hidrocarbonetos apresentam diferentes características, sendo os de baixo peso molecular (até 10 átomos de carbono) altamente voláteis, de elevada solubilidade na água do mar (>95%), toxicidade aguda muito elevada e bioacumulação reduzida (por serem muito voláteis não se encontram biodisponíveis); podem apresentar propriedades anestésicas. Por outro lado, os hidrocarbonetos de peso molecular intermédio (entre 10 e 20 átomos de carbono) têm taxas de evaporação menores, baixa solubilidade na água, toxicidade crónica associada a compostos diaromáticos e potencial de bioacumulação moderado. Os hidrocarbonetos de elevado peso molecular (mais de 20 átomos de carbono) têm taxas de evaporação muito reduzidas, solubilidade na água praticamente inexistente, elevado potencial de bioacumulação (por elevada lipoficidade e por associação a partículas de matéria orgânica e deposição nos sedimentos) e toxicidade crónica elevada, apresentando características cancerígenas (Coimbra *et al.*, 2004; Wetzel e van Vleet, 2004). De um modo geral, os produtos refinados tendem a ser mais tóxicos para o organismo, mas menos persistentes no meio ambiente, enquanto que o petróleo bruto e fuelóleos pesados tendem a ser menos tóxicos, mas mais difíceis de eliminar, provocando mais danos físicos directos nos organismos.

1.2.1 - Fontes e origem dos hidrocarbonetos

São várias as origens naturais dos hidrocarbonetos incluindo a biosíntese por bactérias, fungos e plantas (C17, C29), a decomposição térmica de moléculas orgânicas e

subsequente recombinação das partículas orgânicas formadas (pirólise) e ainda processos naturais como as infiltrações provenientes de depósitos marinhos, actividades vulcânicas e incêndios florestais (McElroy *et al.*, 1989; Witt, 1995; Oros e Ross, 2005, Yunker *et al.*, 2002a).

As fontes antropogénicas de hidrocarbonetos para o ambiente são muito variadas e incluem: efluentes urbanos e industriais, escorrência urbana e descargas ribeirinhas, efluentes das refinarias; derrames de petróleo (transporte, incluindo operações normais dos petroleiros; operações em doca-seca, descarga de balastro e combustível, perdas em acidentes, tráfego marítimo costeiro); plataformas petrolíferas em mar aberto; produção de energia nas centrais eléctricas; incineração de resíduos; aquecimento de habitações; produção de asfalto e gases libertados por motores de combustão interna (Fig. 1.2) (Nitta, 1972; Pérès e Bellau, 1972; Goldberg, 1975; Malins, *et al.*, 1980; Moran *et al.*, 1980; Libes, 1991; GESAMP, 1993; Law e Biscaya, 1994; OSPAR 2000, 2001; UNEP, 2002).

Uma das principais vias de entrada de hidrocarbonetos no meio marinho é a deposição atmosférica. Na atmosfera as principais fontes de hidrocarbonetos são de origem natural, tais como os compostos derivados da pirólise de matéria orgânica (incêndios, por exemplo) e compostos resultantes da actividade vulcânica, seguida de fontes domésticas (aquecimento das habitações e escape dos automóveis). Estes compostos encontram-se na atmosfera tanto no estado gasoso como associados a partículas orgânicas, percorrendo grandes distâncias (por vezes bastante longe dos locais de origem) devido às deslocções das massas de ar, ou sofrem deposição relativamente perto dos locais de origem, no caso dos compostos associados a partículas.

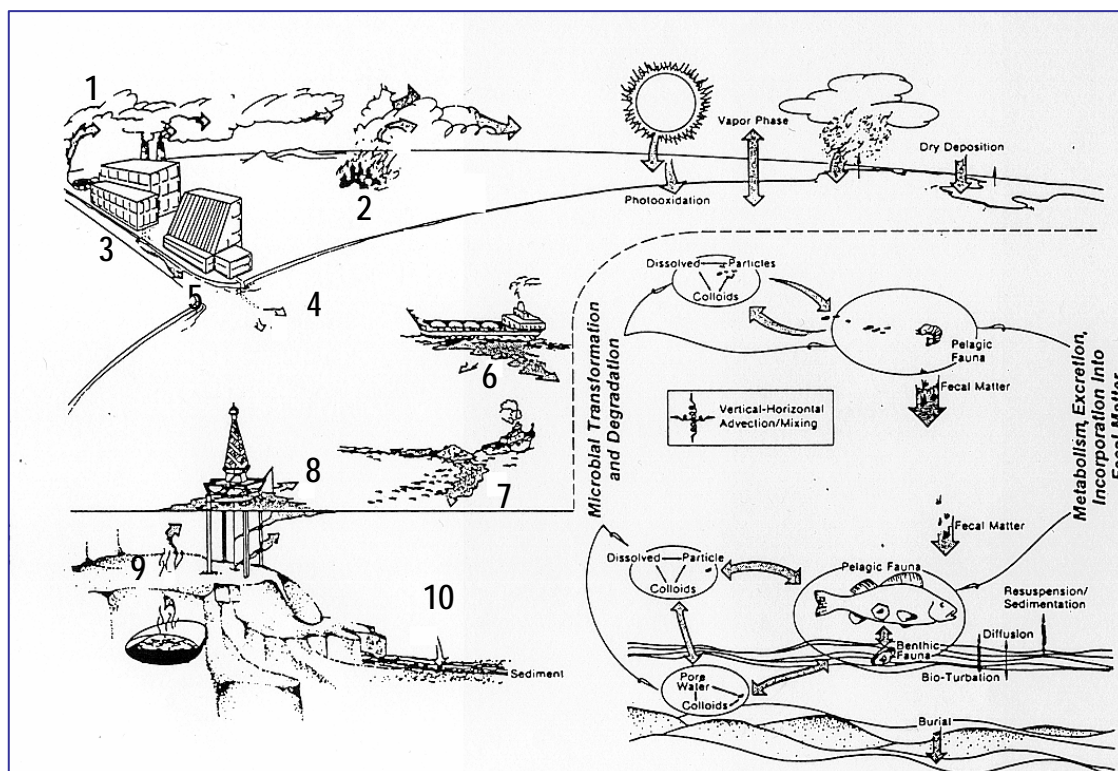


Figura 1.2 - Fontes de hidrocarbonetos no ambiente. (1 - combustão incompleta de combustíveis fósseis; 2 - incêndios florestais; 3 - efluentes industriais; 4 - efluentes urbanos; 5 - transporte fluvial proveniente de áreas interiores; 6 - transporte petrolífero (acidentes e rotinas); 7 - deposição de resíduos no mar; 8 - plataformas petrolíferas (acidentes e rotinas); 9 - infiltrações de depósitos marinhos naturais; 10 - diagénese de compostos orgânicos nos sedimentos) (Adaptado de McElroy *et al.*, 1989)

Outras fontes antropogénicas de hidrocarbonetos incluem as estações eléctricas, processos térmicos industriais, fábricas de combustão, incineradoras, fornos de carvão, indústria do alumínio, ferro e ligas, coquearias, veículos motorizados, asfalto, tratamento e preservação de madeiras, etc.. Lippiatou *et al.*, (1997) refere valores de concentrações de PAHs totais emitidos para a atmosfera que oscilam entre 35 a 70 toneladas.

Os valores relativos a hidrocarbonetos do petróleo libertados por escorrência de rios e de terra para o meio aquático é escassa, embora Lippiatou *et al.* (1997) estime que os *inputs* de PAHs para os rios Ródano e Ebro no Mediterrâneo seja cerca de 5,3 a 33 toneladas/ano e 1,3 toneladas, respectivamente. A diferença das cargas deve-se às diferenças anuais de caudal e ao uso em terra (UNEP, 2002).

Outra fonte adicional de hidrocarbonetos e PAHs para o meio marinho são as lamas das ETARs e material dragado. Os três maiores produtores de lamas são a França, Espanha e Itália que geram uma carga anual de 2,9 toneladas de PAHs (UNEP, 2002). Estima-se que a quantidade de PAHs provenientes de dragados lançados no mar tenha sido cerca de 22,3 ton em 1995 e 48,7 ton em 1996 (Alemanha, Dinamarca, Noruega, e Espanha) (UNEP, 2002; OSPAR 2001). Esta prática foi no entanto proibida nos anos mais recentes. Por outro lado, muitas destas lamas são utilizadas como fertilizantes (1,2 ton) ou nas terraplanagens das estradas (1,2 ton), contribuindo para a contaminação dos solos, enquanto que 180 kg/ano regressam à atmosfera por incineração.

Nos solos, a principal fonte de contaminação provém da deposição de resíduos industriais e domésticos, incorporação dos resíduos das plantas e deposição de partículas proveniente da atmosfera. Os hidrocarbonetos nos solos estão preferencialmente adsorvidos às partículas, principalmente se estas apresentarem uma razão superfície/volume elevada (Bouloubassi e Saliot, 1993, Law *et al.*, 1997).

Tanto os hidrocarbonetos de origem atmosférica como os de origem terrestre chegam ao ambiente aquático, quer através da deposição directa (para o primeiro caso) quer como resultado das escorrências de águas pluviais urbanas e de agricultura, transporte fluvial, descargas directas junto dos focos populacionais (para o segundo caso) (Kennish, 1992; GESAMP, 1993).

As fontes de hidrocarbonetos derivadas directamente do petróleo e/ou dos processos associados são muito significativas, não sendo no entanto os acidentes com petroleiros a principal. O efeito de uma maré negra é desastroso e tem consequências graves para o meio ambiente e vida marinha, afectando também muitas actividades económicas (pesca, moluscicultura, navegação, turismo) mas é considerada local e pontual,

tornando-se mais importantes as fontes crónicas ligadas à exploração e instalações fixas em terra (oleodutos, refinarias) e transporte.

Os acidentes nos oleodutos, juntamente com descargas de rotina das instalações em terra, contribuem para as concentrações elevadas de hidrocarbonetos do petróleo na sua proximidade. Estima-se que cerca de 110.000 toneladas de óleo provêm de fontes industriais diferentes. No Mediterrâneo existem cerca de 40 refinarias de dimensão considerável, com uma capacidade combinada, em 2000, de 438 milhões de toneladas. Por outro lado, os efluentes combinados destas refinarias contêm cerca de 1,9 g óleo por cada tonelada processada. Assim, considerando o volume total de petróleo processado pelos países Mediterrânicos, estima-se que um *input* total de 900 toneladas de óleo e 1,9 kg até 180 kg de PAHs entram no meio marinho por esta via. Estas descargas parecem ser constantes desde os últimos 10 anos (UNEP, 2002). No Atlântico Norte as actividades portuárias são centradas em 20 portos, sendo os 3 mais importantes Nantes, Bilbao e Sines. O transporte de hidrocarbonetos é centrado nestes portos (15; 11,39 e 13,75 milhões de toneladas, respectivamente), enquanto que o tráfego de contentores é principalmente controlado pelos portos de Bilbao, Leixões e Lisboa (2428, 1522 e 2495 mil toneladas, respectivamente) (UNEP, 2002).

Uma das principais fontes difusas (mas frequentes) ligadas ao transporte marítimo do petróleo devem-se às operações de lavagem de porões dos navios no alto mar, e outros pequenos derrames ilegais ou acidentais, que são responsáveis por cerca de oitenta por cento da poluição por hidrocarbonetos de petróleo. O resultado destas operações ao largo é frequentemente visível nas zonas costeiras quando é atingida pela nafta e alcatrão. Estima-se que cerca de 220.000 navios com mais de 100 toneladas, atravessam Mediterrâneo por ano, e que cerca de 250.000 ton de hidrocarbonetos do petróleo são derramados devido a acidentes e a operações como carga/descarga, lastro/de-lastro,

lavagem dos tanques, doca-seca, etc. (Kennish, 1992; UNEP, 2002). De acordo com estes dados, estima-se que a fracção dos hidrocarbonetos aromáticos (PAHs) seja na ordem das 0,3 a 1000 ton, dependendo do volume derramado e do tipo de óleo.

Outras fontes difusas responsáveis por contaminação crónica e persistente são associadas às actividades humanas. Os hidrocarbonetos alifáticos estão frequentemente presentes como resultado do tráfego marítimo, manutenção das embarcações e actividades industriais, enquanto que os PAHs são principalmente resultado da incineração de resíduos orgânicos e da combustão incompleta de combustíveis fósseis (pirólise) (gasóleo, gasolina, fuelóleo). Estão geralmente presentes na relação directa com o grau das actividades industriais, em portos, marinas, refinarias, industria e esgotos urbanos, estando também presentes na atmosfera. Ambos estão presentes nos petróleos (Neff, 2002).

Em resumo, na Tabela 1.1 apresenta-se a quantidade estimada de hidrocarbonetos do petróleo que entra no meio marinho, pelas diferentes fontes.

1.2.2 – Destino do óleo derramado

Como referido anteriormente, as fontes de hidrocarbonetos para o meio marinho são variadas, incluindo-se os acidentes com petroleiros, operações de limpeza e descarga de resíduos. Cada um destes produtos apresenta uma composição diferente e por conseguinte terão comportamentos específicos na coluna de água. Estes dependem também das propriedades físico-químicas do próprio meio (temperatura, salinidade, nutrientes), velocidade do vento e ondulação (Fig. 1.3), tornando-se difícil fazer uma previsão correcta do impacto que pode ocorrer em determinado ecossistema. Deste

modo, é fundamental conhecer a composição do produto derramado e compreender o comportamento deste no meio marinho (Henry, 1998; Kingston, 2002; Coimbra *et al.*, 2004).

Tabela 1.1 – Quantidade anual de hidrocarbonetos de petróleo que se estima entrar no meio marinho (Adaptado de Clark, 2001).

Fonte	Quantidade (toneladas)
<u>Transportes</u>	
Operações com petroleiros	163.000
Acidentes com petroleiros	162.000
Resíduos (bilge) e combustível	524.000
Doca seca	9.000
Acidentes com não-petroleiros	20.000
Emissões atmosféricas	3.750 x10 ³
<u>Instalações fixas</u>	
Refinarias	100.000
Produção <i>off-shore</i>	50.000
Oleodutos	30.000
<u>Outras fontes</u>	
Resíduos municipais	700.000
Resíduos industriais	200.000
Escorrências urbana e ribeirinha	160.000
Deposição atmosférica	300.000
Deposição de resíduos no mar	20.000
<u>Inputs naturais</u>	
Libertação das jazidas	250.000
Biosíntese	26.000
Deposição atmosférica	100-4000 x10 ³

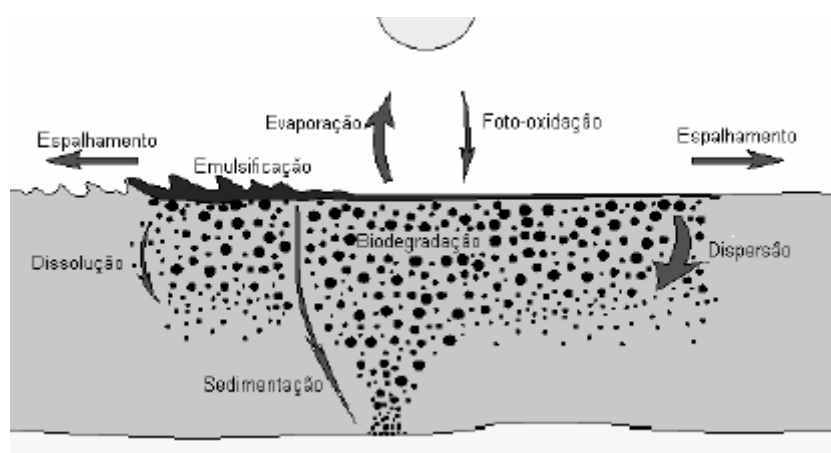


Figura 1.3 - Comportamento do petróleo após derrame no mar e principais processos envolvidos (Adaptado de Fernandes, 2001).

Durante um derrame, forma-se inicialmente um filme superficial com alguns milímetros de espessura que alastra rapidamente aumentando a área de impacto (espalhamento), ao mesmo tempo que os compostos voláteis (de menor peso molecular) se evaporam, e se regista um aumento da proporção de PAHs de elevado peso molecular, mais tóxicos (McElroy *et al.*, 1989; Kennish, 1992; Witt, 1995). Estes hidrocarbonetos permanecem no meio durante muito tempo, podendo por conseguinte vir a ser incorporados nos tecidos dos organismos. A taxa de espalhamento e espessura do filme depende do tipo de óleo derramado: os óleos leves espalham-se mais rapidamente e formam um filme mais fino que os óleos pesados. Consoante a velocidade do vento, esta mancha pode sofrer deriva, podendo atingir velocidades de 3 a 4% da velocidade do vento (Clark, 2001). Nas zonas costeiras e estuários, as marés e as correntes têm uma grande influência no movimento da mancha. Se o óleo é incorporado na massa de água, o seu movimento é condicionado principalmente pelas correntes.

A evaporação é um processo muito importante nos primeiros dias após um derrame, principalmente se for relativo a produtos refinados, como a gasolina, que se evapora quase 100% numa questão de dias. Outros produtos sofrem evaporação de 5 a 60%, consoante se trate de um petróleo leve ou pesado. Os *n*-alcanos (C11, C12 e C13) e os aromáticos (<9 átomos de carbono) mais leves são evaporados durante as primeiras horas e/ou dias após o derrame (Fig. 1.4). Por outro lado, a evaporação dos componentes mais voláteis aumenta a densidade e viscosidade da mancha de óleo, podendo os compostos mais pesados continuar a sofrer outros processos de envelhecimento. A evaporação é, portanto, o primeiro processo envolvido na remoção de óleo da superfície da água. A taxa e extensão da evaporação dependem de diversos factores, tais como as fracções com baixo peso molecular e ponto de ebulição, área

superficial e espessura da mancha, velocidade do vento, estado do mar e temperatura do ar e da água e radiação solar (foto-oxidação) (Clark, 2001).

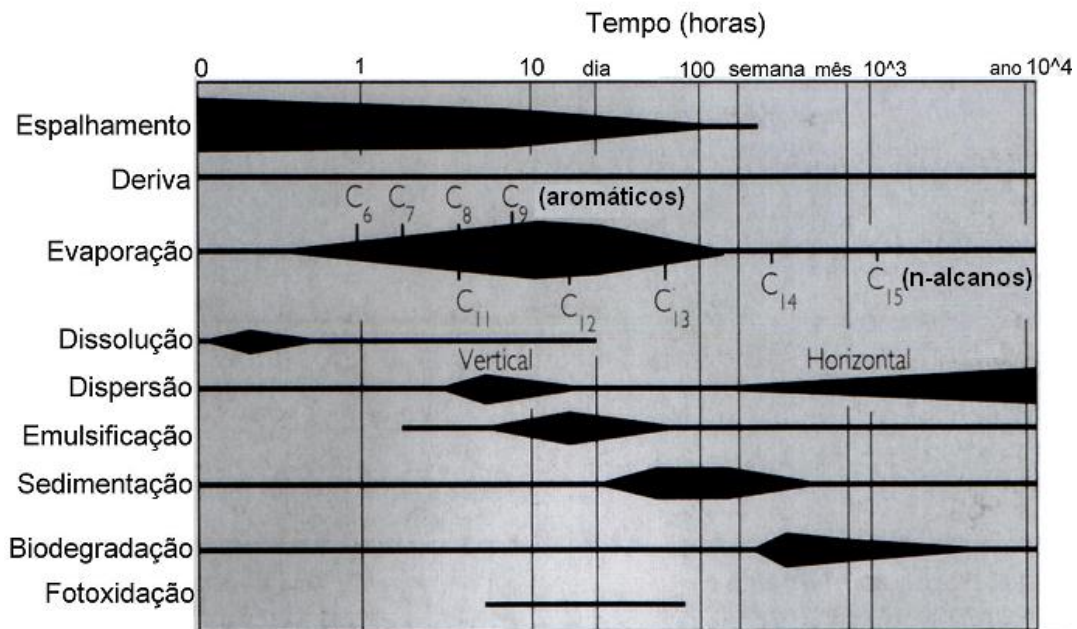


Figura 1.4 - Períodos de tempo envolvidos nos processos de degradação dos óleos (Adaptado de Clark, 2001).

A dispersão e dissolução vertical são processos físicos em que as gotículas de óleo são transportadas a partir da superfície do mar para a coluna de água, sobretudo devido à agitação marítima. Essas gotículas podem ter dimensões variáveis, e as mais pequenas não voltam à superfície devido à turbulência natural da água, difundindo-se na coluna de água. Este processo é influenciado pela viscosidade do óleo, temperatura da água e do ar e estado do mar. Quanto maior for a viscosidade do produto, maior é a possibilidade de se formarem espessas camadas de óleo na superfície da água, e assim diminuir a dispersão na água, ao contrário dos hidrocarbonetos menos viscosos que facilmente se podem dispersar ao fim de alguns dias.

Outro fenômeno que pode ocorrer é a emulsificação. A formação de emulsões não é mais do que a dispersão de pequenas gotículas de um líquido dentro de outro. Pode-se, assim, estar na presença de dois tipos de emulsões: óleo-na-água – que acaba por ser o processo de dispersão já referido – e água-no-óleo, também designada por formação de mousse, formando uma emulsão estável e persistente. Uma emulsão estável pode conter 80 a 90% de água e a sua estabilidade depende do conteúdo em asfaltenos e parafinas do petróleo. Daí que a maior parte dos produtos refinados não formem emulsões água-no-óleo estáveis devido à ausência de parafinas e asfaltenos. A mínima percentagem de massa, de asfaltenos e de parafinas, para estabilizar uma emulsão é de cerca de 3% (Fingas *et al.* 1996). Estes compostos são estabilizados em muitos óleos/crude pelos solventes aromáticos. Assim, à medida que processos como a evaporação e foto-oxidação eliminam os solventes aromáticos, o conteúdo de asfaltenos e parafinas no petróleo altera-se e estes compostos começam a precipitar, reduzindo a tensão superficial da interface óleo-água e originando o processo de emulsificação, sendo que as gotículas de água, após se dispersarem na fase do óleo, ficam estabilizadas pelos asfaltenos e parafinas precipitados. É, pois, comum que a maioria do óleo/crude só inicie a emulsificação após uma certa fase de envelhecimento. A ocorrência deste processo, para além de depender da composição do petróleo, depende também do estado do mar, sendo que a formação de emulsões é favorecida na presença de mar agitado. A emulsificação é considerada muitas vezes como o 2º processo mais importante, logo após a evaporação, devido ao efeito significativo que o mesmo tem no comportamento das manchas de petróleo no mar. As emulsões e os resíduos pesados do crude podem formar bolas de alcatrão, cujo tamanho varia entre 1 mm até 10-20 cm de diâmetro. Estas apresentam uma área superficial reduzida em comparação com o volume, pelo que a sua taxa de degradação é extremamente lenta (Clark, 2001). Bolas de alcatrão de

vários tamanhos ocorrem na superfície da água de todos os oceanos, embora predominem nas rotas principais de navegação e nas principais correntes oceânicas, e derivam principalmente das lavagens dos tanques e das operações náuticas de rotina.

Por outro lado, parte do petróleo acaba por sedimentar frequentemente associado a matéria em suspensão na coluna de água, originando um aumento da massa volúmica e consequentemente o movimento descendente das partículas na coluna de água até ao fundo do mar. A evaporação, dissolução e emulsificação favorecem a sedimentação natural do óleo, por aumento da massa volúmica. Um factor importante na sedimentação de compostos de petróleo é a adsorção às partículas de matéria em suspensão, favorecida pela reduzida solubilidade e pelo elevado coeficiente de partição octanol/água. Por conseguinte, a maior concentração de partículas em suspensão existente nas zonas costeiras torna o processo de sedimentação mais importante junto à costa, embora este processo seja em geral, pouco importante nos primeiros dias.

O facto destes compostos poderem estar adsorvidos às partículas, que posteriormente se depositam e integram os sedimentos marinhos, tornam a sua oxidação química e microbiológica mais difícil, especialmente se os sedimentos forem anóxicos, sendo a degradação ainda mais lenta para os compostos de elevado peso molecular (Laws, 1993). De facto, as taxas de degradação microbiana dependem da estrutura e peso molecular dos compostos, decrescendo na seguinte ordem: *n*-alcanos > isoalcanos > hidrocarbonetos aromáticos > hidrocarbonetos cíclicos e aumento do peso molecular (GESAMP, 1993).

1.2.3 – Derrames de petróleo em Portugal

A Zona Económica Exclusiva (ZEE) de Portugal, que se estende até às 200 milhas é atravessada por alguns dos principais e mais movimentados Esquemas de Separação de Tráfego (ESTs) de navios de/para o Mediterrâneo, Norte da Europa, África e América (Fig.1.5), apresentando um risco considerável de poluição marinha, quer pela quantidade de tráfego que nelas circula, quer pela diversidade de cargas transportadas (DGA, 2000).

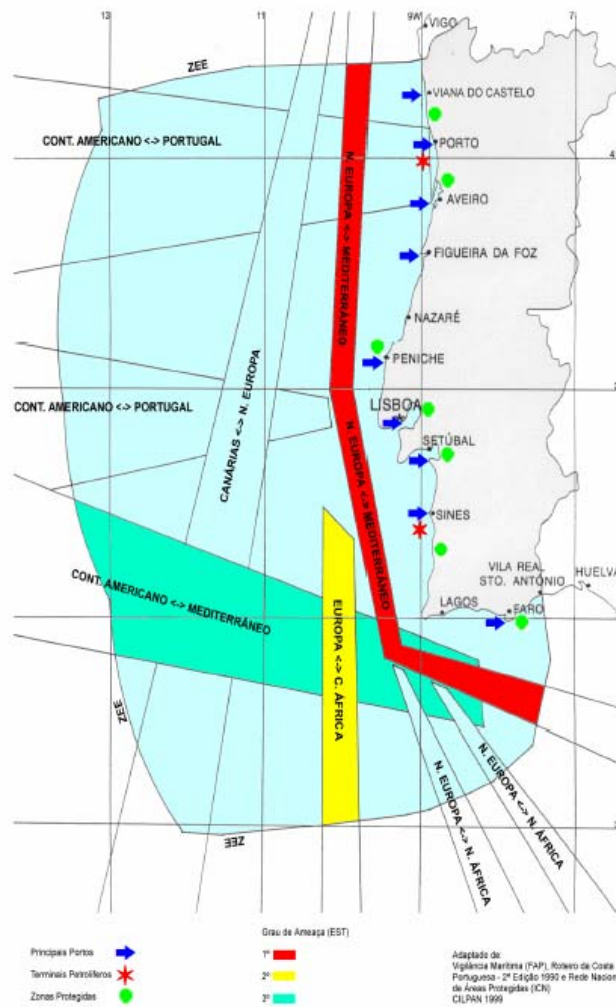


Figura 1.5 - Corredores de navegação da ZEE Portuguesa (CNADS, 2001).

De facto, tal como referido anteriormente, estima-se que cerca de 220.000 navios com mais de 100 toneladas, atravessam Mediterrâneo por ano, utilizando os corredores de tráfego marítimo internacionais que passam na ZEE Portuguesa, além do tráfego nos corredores nacionais, onde navegam, por dia, cerca de 200 navios transportando mais de 500 toneladas de mercadorias diversas, 40 dos quais são petroleiros. Como exemplo, desde 1990 foram contabilizados pela Direcção Geral da Marinha cerca de 700 derrames de maior ou menor gravidade, dos quais cerca de 25% é de origem desconhecida. No que respeita à localização do total de acidentes registados em território português nas últimas décadas, área que engloba os três portos mais importantes – Lisboa, Setúbal e Sines - representam a maior quantidade (Fig. 1.6). Por outro lado, segundo os dados referidos pelo Centro Internacional de Luta Contra a Poluição do Atlântico Nordeste (CILPAN), em 2003 o número de ocorrências de descargas de hidrocarbonetos nas praias do Algarve e na ZEE a sul do Cabo Sardão foi reduzido (2 ocorrências) em comparação com o que se tem verificado desde 1990 e 1991 (11 ocorrências), com excepção para o ano de 1999, que apresentou um número inferior (1 ocorrência), perfazendo este período de 1990-2003 um total de 82 ocorrências (Fig. 1.7). Na costa Sul de Portugal as zonas mais vulneráveis a acidentes e derrames são os portos e zonas de aproximação aos portos e ainda a zona do Cabo de S. Vicente, devido ao intenso tráfego marítimo, à proximidade excessiva à costa da EST (5 milhas) e à inexistência de um sistema de controlo de tráfego marítimo (CCDRA, 2004, 2005).

Na Tabela 1.2 estão indicados os maiores acidentes de petróleo ocorridos em Portugal (e outros pontos), mostrando que o território nacional sofre em média um acidente grave por ano.

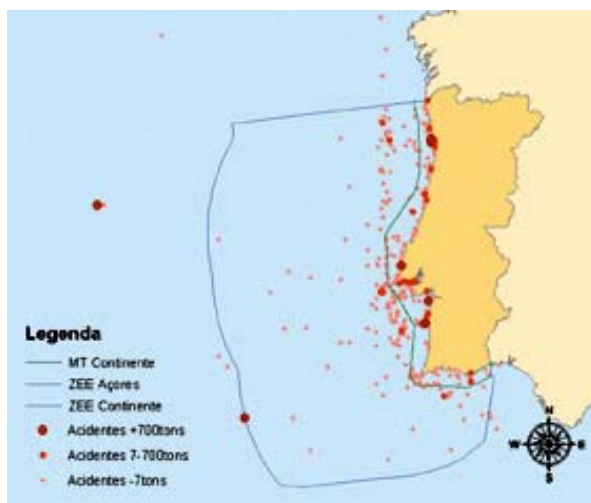


Figura 1.6 - Acidentes ocorridos no mar territorial e ZEE do Continente entre 1971 e 2002 (Monteiro e Gouveia, 2005).

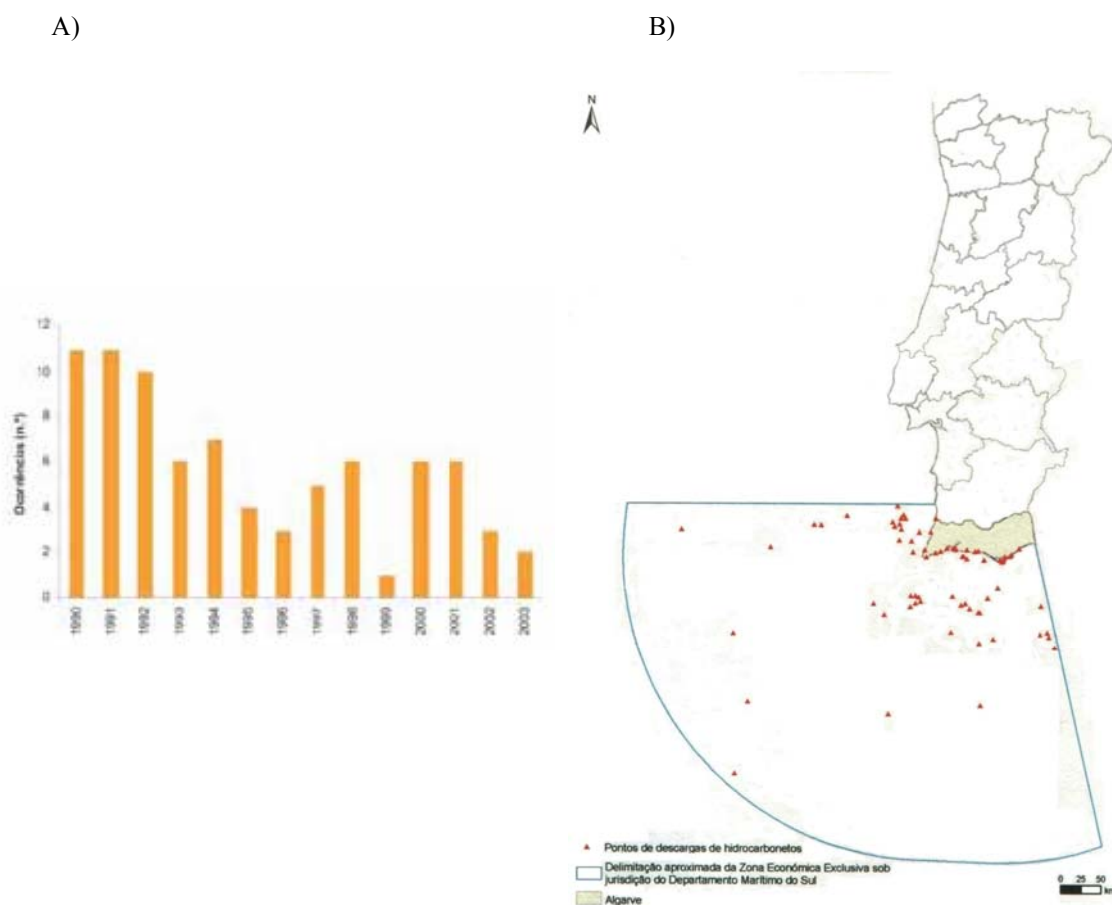


Figura 1.7 - Número (A) e distribuição (B) dos pontos descarga de hidrocarbonetos na ZEE sob jurisdição do Departamento Marítimo do Sul, entre 1990 e 2003 (CCDRA, 2004).

Tabela 1.2 - Principais derrames de petróleo ocorridos em Portugal, e noutros locais.

Tanque	Ano	Local	Petróleo libertado (toneladas)
Torrey Canyon (encalhe)	1967	Ilhas Scilly, Reino Unido	199.000 ^g
Sea Star (colisão)	1972	Golfo de Omã	115.000 ^g
Ouranos (encalhe)	1974	Cabo S. Vicente, Portugal	800 ^e
Jacob Maersk	1975	Leixões	80.000 ^e
Monte Urkiola	1976	La Coruña, Galiza, Espanha	100.000 ^a
Summer Breeze (encalhe)	1977	São Miguel	Combustível
Hawaiian Patriot (falha no casco)	1977	320 m.n. ao largo do Havai	95.000 ^g
Atlas Titan (explosão)	1978	Estuário do Sado	Crude
Alchemist Endem (encalhe)	1978	Ericeira	1.600 substâncias perigosas ^f
Amoco Cadiz	1978	Costa da Bretanha, França	223.000 ^e
Atlantic Empress (colisão)	1979	Ao largo de Tobago	287.000 ^g
Campeon (explosão)	1980	Sines	Gasolina
Angra (encalhe)	1983	Praia Grande	Gasóleo
Castillo de Bellver (falha no casco)	1983	70 m.n. ao largo da Cidade do Cabo	257.000 ^g
Boar Isik (encalhe)	1985	Setúbal	Carvão e fuelóleo
Mansfeld (encalhe)	1986	Leirosa	Combustível
Santa Maria	1986	Doca de S ^{to} António	5
Cason	1987	La Coruña, Galiza, Espanha	100.00 ^e
Nisa (operações)	1987	Sines	900 crude Arabian light ^f
Odysee	1988	700 m.n. ao largo da Nova Escócia	132.000 ^h
Reijin (encalhe)	1988	Douro	430 combustível e lubrificantes
Exxon Valdez	1989	Alasca (Prince William Sound)	35.500 crude Alaskan North Slope ^d
River Gurara (naufrágio)	1989	Espichel	900 combustível e lubrificantes
Marão (rombo)	1989	Sines	4.500 crude Iranian heavy ^e
Kharg V	1990	Porto Santo	70.000 crude ^f
Aragon (rombo)	1990	Porto Santo	30.000 crude Maya ^f
Sea Spirit	1990	Gibraltar	12.200 ^a
Entrust Faith (naufrágio)	1991	Ponta Delgada	1.200 fuel
Haven	1991	Génova, Itália	144.000 ^a
ATB Summer (explosão/incêndio)	1991	700 m.n. ao largo de Angola	260.000 ^g
Desconhecido (lavagem de tanques)	1992	Figueira da Foz	800 crude Maya ^f
Aegean Sea	1992	La Coruña, Galiza, Espanha	79.000 (Brent) ^b
Erika Doger	1992	Figueira da Foz	1.500 ^e
Ronjay Tihi (encalhe)	1993	Leixões	220 fuel+70 diesel e lubrificantes
Braer (encalhe)	1993	Ilhas Shetland, Reino Unido	85.000 ^g
New World e Ya Mawlaya (colisão)	1994	Cabo S. Vicente, Portugal	30.000 crude Rabi light ^f
Vianna (incêndio/afundamento)	1994	Porto da Horta	500 diesel+10 lubrificantes
Cercal (encalhe)	1994	Leixões	3.000 crude Arabian light ^f
Sea Empress (encalhe)	1996	Milford Haven, Reino Unido	72.000 ^g
Desconhecido (lavagem de tanques)	1998	Figueira da Foz	500 crude degradado ^f
Erika	1999	Costa da Bretanha, França	15.000 ^e
Estella Pampeana	1999	Argentina	1.000 ^a
Coral Bulker	2000	Viana do Castelo	700 fuel e gasóleo ^f
Prestige	2002	La Coruña, Galiza, Espanha	77.000 ^c
Tasman Spirit	2003	Ao largo de Karachi, Paquistão	12.000 ^h
Everton	2004	400 m.n. ao largo de Omã	6.500 ^h
Solar 1	2006	Filipinas	2.000 ^h
Hebei Spirit	2007	Coreia do Sul	10.800 ^h

a- UNEP, 2002; b – Porte *et al.*, 2000 ab; c – Soriano *et al.*, 2006; d – Page *et al.*, 2006; e -OSPAR, 2000; f – Fernandes, 2001; g – Clark, 2001; h – Garmendia, 2008

O facto do número de registos ter aumentado significativamente nos últimos anos pode não significar um aumento real de acidentes, mas sim um aumento da capacidade de detecção de manchas de poluição através de voos sobre o mar e uma maior qualidade dos meios empregues nessas missões. Refira-se ainda que mais de metade da quantidade derramada e de acidentes registados ocorreram especificamente nos portos devido a operações com navios (Monteiro e Gouveia, 2005).

Apesar de tudo, Portugal tem vindo a adoptar medidas de prevenção relativas ao transporte de substâncias perigosas. Salienta-se a adopção do Plano de Emergência – PML (Plano Mar Limpo) e do acordo MARPOL (poluição marinha), ambos em 1993, da ratificação Convenção sobre o Direito do Mar, em 1997, e da recente modificação do regime de contra-ordenações no âmbito da poluição do meio marinho (deliberada em Setembro de 2000). No âmbito comunitário, foram criados diversos acordos regionais, dos quais se salienta o Acordo de Lisboa, assinado em 1990, mas ratificado por todas as Partes em 2008.

Após o acidente do Prestige na costa da Galiza, Portugal adoptou medidas para poder alterar as distâncias à costa dos esquemas de separação de tráfego (EST) particularmente no Cabo de S. Vicente, uma vez que a maioria dos incidentes de poluição ocorridos nos espaços marítimos nacionais se concentram nos EST e nos trajectos intermédios, além do acesso aos principais portos do continente (ver Fig. 1.5). Foi alterado o EST do Cabo da Roca (que passou de 9 para 14 milhas de distância mínima à costa) e do Cabo de S. Vicente (que passou de 5 para 14 milhas), e à semelhança da EST do Cabo Finisterra (alterado após o derrame do Prestige) desdobrou-se cada um dos corredores (o ascendente e o descendente), em dois, criando-se quatro vias de trânsito em cada sistema de roteamento. Em cada sentido passam a existir dois corredores de tráfego: um mais afastado em que circularão os navios que

transportem cargas perigosas para o meio marinho e outro corredor interior para os restantes navios. Esta alteração baseou-se na necessidade de proteger os recursos costeiros e a biodiversidade da interface litoral, permitindo, por outro lado, períodos de resposta maiores no caso de ocorrer um acidente que envolva o derrame de hidrocarbonetos para o meio marinho (Monteiro e Gouveia, 2005).

A recuperação de um ecossistema após um derrame de petróleo inicia-se assim que os níveis do poluente presente sejam toleráveis pelos organismos que formam as comunidades biológicas. A recolonização depende da época do ano (reprodução), disponibilidade de formas colonizadoras, interações biológicas, factores ambientais e propriedades físico-químicas do meio (Schratzberger *et al.*, 2003, Coimbra *et al.*, 2004). No entanto, os efeitos tóxicos de um derrame podem fazer-se sentir muito além do tempo da recuperação ambiental visível, pois os hidrocarbonetos apresentam características que favorecem a sua acumulação nos tecidos, são potencialmente mutagénicos e carcinogénicos e causam uma série de efeitos adversos que podem posteriormente diminuir o potencial de crescimento e por em risco a capacidade de reprodução.

1.3 – Efeito dos hidrocarbonetos nos organismos

Tal como referido anteriormente, o impacto dos derrames de petróleo nas comunidades marinhas é variado, e depende em larga medida do tipo de petróleo derramado (crude, fuel, nafta) e do local atingido. Provocam mortalidades imediatas e por vezes massivas,

por anóxia, hipotermia ou envenenamento nas espécies que tomam contacto directo com o crude (peixes, aves, mamíferos, comunidades de substratos fixos (como mexilhões), crustáceos). A mancha superficial reduz drasticamente a luz e as trocas gasosas entre o oceano e a atmosfera, levando à diminuição da produção primária (fitoplâncton). Ao sedimentar e se acumular nos sedimentos, estes compostos são degradados lentamente e serão progressivamente libertados diversos produtos de biodegradação e/ou metabolitos de toxicidade variável, que podem ser acumulados nos tecidos dos organismos. Porém, nas zonas costeiras de baixa profundidade, os processos físicos de turbulência, das correntes, as dragagens e a deposição das mesmas e a bioturbação dos sedimentos provocados pelos organismos bentónicos, promovem a redistribuição dos hidrocarbonetos e os associados (McElroy *et al.*, 1989; Law & Biscaya, 1994).

Assim, o efeito dos hidrocarbonetos nos organismos depende da sua forma biodisponível (por norma de baixa solubilidade e elevada lipoficidade), da concentração, das propriedades do meio (como temperatura, salinidade, quantidade de matéria orgânica, etc), assim como do organismo em si. As vias de entrada dos compostos estão intimamente ligadas ao modo de vida dos organismos, podendo ser alimentar, respiratória ou de contacto. Todos estes factores irão condicionar a acumulação, o efeito tóxico e o metabolismo destes compostos.

1.3.1 - Biodisponibilidade e bioacumulação

Por definição, biodisponibilidade é a forma química do contaminante no ambiente que se encontra disponível para desenvolver uma acção biológica no organismo ou, mais especificamente, é a percentagem da quantidade total do contaminante que ao entrar em contacto com o organismo é realmente absorvida pelo mesmo (Spacie, *et al.*, 1995).

Uma vez no meio aquático, os hidrocarbonetos podem ser encontrados em vários compartimentos do meio: água, partículas em suspensão e biota. A baixa solubilidade e hidrofobicidade, característica dos hidrocarbonetos de petróleo, influenciam grandemente o grau com que os hidrocarbonetos são acumulados nos organismos (Guzzella & Paolis, 1994). Os compostos mais solúveis (de baixo peso molecular) são também os mais voláteis, e estão menos biodisponíveis para acumulação, enquanto que os de peso molecular elevado, ao apresentarem menores solubilidades na água, poderão não estar biodisponíveis na forma dissolvida. Por outro lado, a baixa solubilidade reflecte uma elevada hidrofobicidade e lipoficidade, facto este que se sobrepõe ao efeito de baixa concentração dos compostos orgânicos na água, ou seja, mesmo que a concentração dos hidrocarbonetos seja muito baixa, estes são rapidamente incorporados nos tecidos dos organismos (bioacumulação), devido à sua grande lipoficidade (traduzida pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow})). Este equilíbrio pode ser atingido durante horas, para os compostos mais solúveis ($\log K_{ow} < 3$, como o tolueno) até semanas ou mesmo meses, para compostos mais hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 7$, como o hexaclorobifenilo) (Widdows e Donkin, 1992). Para compostos “superlipofílicos” ($K_{ow} > 10^6$) a bioacumulação sofre um decréscimo, devido ao aumento de tempo necessário para que se atinja o equilíbrio efectivo dentro dos tecidos. Este é mais ou menos de 6 meses, para compostos com $K_{ow} = 10^6$, aumentando até 10 anos para compostos com $K_{ow} > 10^6$, não se observando bioacumulação significativa para compostos com $K_{ow} > 10^{13}$. A diminuição da bioacumulação de compostos superlipofílicos parece estar associada tanto com o tamanho da molécula como com a solubilidade do composto na água (Livingstone *et al.*, 1992b). A solubilidade de compostos como os hidrocarbonetos em águas salinas, é influenciada pela temperatura e pela salinidade (em termos de força iónica e composição): a temperatura aumenta a solubilidade 2 a 5 vezes, em intervalos

de temperatura de 4°C a 28°C, enquanto que a salinidade diminui a solubilidade dos hidrocarbonetos 2 vezes para intervalos 0 a 36‰ (Farrington, 1989).

Outro factor importante na biodisponibilidade dos hidrocarbonetos no meio marinho é a quantidade e tipo de matéria orgânica particulada e/ou dissolvida existente. Os hidrocarbonetos de maior peso molecular tendem a adsorver-se às partículas orgânicas e coloides em suspensão, devido ao elevado coeficiente de partição octanol/água. Estas partículas orgânicas posteriormente floculam e são depositadas nas camadas superficiais dos sedimentos (interface água/sedimento), tornando-se os sedimentos em depósitos de compostos orgânicos do petróleo (Readman *et al.*, 1982; McElroy *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1992; Fu, *et al.*, 1994; Law & Biscaya, 1994).

A matéria orgânica dissolvida nas águas salgadas parece aumentar a solubilização dos hidrocarbonetos, na medida em que reduz a sua presença na forma dispersa, diminuindo a taxa de acumulação nos organismos filtradores quer pela via alimentar quer pela adsorção na superfície das brânquias (McElroy *et al.*, 1989). Por outro lado, concluiu-se que a acumulação de hidrocarbonetos aromáticos e PCBs pelo *Mytilus edulis* expostos a sedimentos contaminados faz-se primeiramente pela fase aquosa embora os sedimentos fossem claramente a fonte do material contaminado. Este facto indica que a acumulação de hidrocarbonetos aromáticos pelos mexilhões não é favorecida pelos sedimentos quando comparada com a acumulação a partir da água (Widdows e Donkin, 1992). No entanto, quando os compostos orgânicos estão adsorvidos às partículas alimentares (microalgas, por exemplo) os teores destes compostos podem aumentar significativamente nos tecidos dos organismos filtradores como o mexilhão *Mytilus edulis*, embora tal aumento não se verifique nos organismos detritívoros como no bivalve *Abra nitida*, em que a influência da matéria em suspensão tem menor

importância na acumulação de hidrocarbonetos, sendo o sedimento a principal fonte dos mesmos (Widdows e Donkin, 1992).

Após a entrada do composto no organismo, a condição fisiológica dos indivíduos e a composição bioquímica dos mesmos irá ser importante na distribuição da contaminação pelos diferentes órgãos e na acumulação ao nível do organismo total. Geralmente, quando o fluxo de contaminantes orgânicos entre organismos ricos em lípidos e o seu ambiente se aproximam de um estado estacionário, a distribuição dos xenobióticos nos tecidos pode ser correlacionada com a concentração lipídica destes. Assim, factores que afectem a concentração lipídica tais como variações sazonais de armazenamento alimentar nos tecidos digestivos e reprodutivos e a formação de ovos ricos em lípidos, podem afectar a acumulação e a distribuição dos contaminantes pelos tecidos. Por outro lado, a desova de ovos ricos em reservas lipídicas podem representar a maior via de excreção de compostos orgânicos hidrofóbicos (Widdows e Donkin, 1992).

Assim, a bioacumulação dos hidrocarbonetos do petróleo pelos organismos depende tanto de factores abióticos como de factores bióticos, os quais vão alterar a biodisponibilidade. A bioacumulação da maioria dos compostos envolve uma taxa de acumulação exponencial, seguida de uma eventual estabilização no equilíbrio máximo da concentração nos tecidos, ambos (acumulação e posterior equilíbrio) aumentando com a concentração do composto (Livingstone e Pipe, 1992). Pensa-se que a entrada do composto nos organismos seja essencialmente um processo passivo, envolvendo a deslocação e o equilíbrio do composto entre os compartimentos da fase aquosa (externa) e biótica (organismo). No entanto, possíveis mecanismos para uma bioacumulação selectiva incluem o fenómeno de penetração através das membranas, locais específicos de ligação, formação de aductos macromoleculares e localização em organelos celulares tais como os lisossomas (Livingstone, 1992; Livingstone e Pipe, 1992).

A depuração, tal como a acumulação, também parece ser um processo passivo apresentando uma curva exponencial a qual pode ser bastante afectada pelo tempo de duração da exposição ao composto. Assim, para um tempo de exposição relativamente curto a depuração geralmente é um processo rápido e completo, enquanto que para tempos de exposição longos a eliminação é mais lenta e incompleta, particularmente para hidrocarbonetos aromáticos (Livingstone e Pipe, 1992). Os mecanismos deste processo ainda estão pouco estudados, podendo ser interpretado em termos de uma estabilização do xenobiótico em compartimentos moleculares ou celulares, com uma menor taxa de metabolização do composto. Por outro lado, quer a estrutura química e a hidrofobicidade do químico, quer a temperatura ou estação do ano (através dos teores em lípidos) afectam a eliminação deste tipo de compostos (Livingstone e Pipe, 1992).

Uma vez que o meio marinho tem vindo a ser um local de deposição destes compostos, especialmente nas zonas costeiras, é possível encontrar um elevado número de espécies contaminadas, em maior ou menor grau. Nas Tabelas 1.3 e 1.4 são apresentados níveis de hidrocarbonetos de petróleo (alifáticos e aromáticos) acumulados por várias espécies, após derrames de petróleo e em programas de avaliação de qualidade ambiental em locais contaminados com estes compostos orgânicos.

Tabela 1.3 – Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (TAlc e UCM) e razões de diagnóstico, em várias espécies e locais do mundo.

Espécie	Local	TAlc (ug/g ph) [§]	UCM (ug/g ph) [§]	UCM/TAlc	Pris/Fit	CPI	17/Pris	Referência
<i>Cerastoderma edule</i>	Galiza ³	0,32-17,6			0,35-3,93	1,07-5,61	0,64-8,32	Carro <i>et al.</i> , 2006
<i>Strombus gigas</i>	Florida	1,7±2,2						Snedaker <i>et al.</i> , 1995
<i>Corbicula fluminea</i>	Argentina ¹			52				Colombo <i>et al.</i> , 2005
<i>Pinctada radiata</i>	Golfo Pérsico	0,16 – 0,42*	2,4 – 24*	8,6 – 66,7				Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccostrea cucullata</i> ,	Golfo Pérsico	0,34 – 1,1*	1,82 - 26*	4,8 – 24,5				Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Circentia callipyga</i>	Golfo Pérsico	0,24	4,2	17,5				Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Pteria colymbus</i>	Florida	3,2±1,2						Snedaker <i>et al.</i> , 1995
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Fontes hidrotermais	11,4 – 25,8	8,5 - 41	1 - 4	0,1 – 0,3	0,9 – 1,1		Serafim <i>et al.</i> , 2008
<i>Mytilus edulis</i>	Dinamarca	7,5 - 108 (17)	5 - 99 (14)		1,7-145 (7,6)			Granby e Spliid, 1995
	Galiza ²	0,33 - 0,65*	7 - 25,6*	13,2 - 46,3	0,52 - 1,83	1,25 - 2,80		Solé <i>et al.</i> , 1996
	Galiza ²		7 - 717*					Porte <i>et al.</i> , 2000
	Reino Unido		1,8 - 795*					Rowland <i>et al.</i> , 2001
<i>M. galloprovincialis</i>	Galiza	0,13 - 0,83	1,5 - 39,7	11, 2 - 85, 6	0,9 - 6,1	1,4 - 3,6		Porte <i>et al.</i> , 2001 a
	Galiza	0,09 - 6,2						Hermida-Ameijeiras <i>et al.</i> , 1994 a, b
	Galiza ³	0,88-5,1			0,27-14,6	0,07-2,8	0,16-8,8	Carro <i>et al.</i> , 2006
	Golfo de Nápoles	1,2 - 48						Amodio-Conchiery <i>et al.</i> , 2003
	Mar Adriático		27,6 - 108*					Livingstone <i>et al.</i> , 1995
	Mar Adriático	7,8- 40,6*	79,6 - 156					Wetzel e Van Vleet 2004
	Mar Ionian; Itália	0,5 - 10						UNEP, 1988
	NW Portugal	8 - 33,7*	70 - 434*					Lima <i>et al.</i> , 2007a
	NW Portugal	0,1 - 30			0,6 - 2,9		0,3 - 2	Ferreira <i>et al.</i> , 2003
	Sul de Portugal	14 - 20	80 - 205	4 - 12	0,8 – 1,3	1 – 1,1		Serafim <i>et al.</i> , 2008
	Sul de Portugal	1,1 - 34,3 (3,7)	21 - 776 (62)	5 - 51 (19)	0,6 - 2,3 (1,1)	0,7 - 1,2 (0,9)	0,2 - 1,6 (0,7)	(esta tese)
	Sul de Portugal	8,7 - 38,3 (12,3)	50 - 205 (100)	4 - 12 (6)	0,5 - 1,7 (1,0)	0,9 - 1,1 (1,0)	0,2 - 0,9 (0,5)	(esta tese)
	Veneza		33,4 - 312*					Livingstone <i>et al.</i> , 1995
Veneza	0,28 - 1,44*	19,6 - 115*					Solé <i>et al.</i> , 2000a	
Veneza	16 - 26,2*	163,4 - 181,4*					Wetzel e Van Vleet 2004	

1 - Estrella Pampeana; 2 - Aegean Sea; 3 – Prestige; § - valores da mediana entre parêntesis; * - valores em peso húmido, calculados a partir dos dados originais publicados em peso seco, assumindo uma proporção 1:5 (ps:ph).

Tabela 1.4 – Concentração de PAHs em várias espécies de moluscos e locais do mundo.

Espécie	Local	Data	PAH (ng/g ph)	Referência
Amêijoas				
<i>Circentia callipyga</i>	Golfo Pérsico	2000-2001	10,6*	Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Corbicula fluminea</i>	Argentina ¹	1999	0,2 – 3,2*	Colombo <i>et al.</i> , 2005
	Baía de São Francisco		15,6 - 144*	Oros e Ross 2005
<i>Macoma baltica</i>	Mar Báltico; Suécia		0,57 - 170 ^a	Näf <i>et al</i> 1994
<i>Potamocorbula amurensis</i>	Baía de São Francisco		99,2 – 200,4*	Pereira <i>et al.</i> , 1992
<i>R. decussatus</i>	Delta do Ebro	1990	20 - 120 ^b	Solé <i>et al.</i> , 2000b
	Ria Formosa	1994-1995	30,4 - 1191	Barreira <i>et al.</i> , 2007 a,b
<i>Rangia cuneata</i>	Bayou Bonfouca, Lousiana		16,2 ^a	DeLeon <i>et al.</i> , 1988
<i>Tapes semidecussata</i>	Delta do Ebro	1990	339 ^c	Solé <i>et al.</i> , 1994
	Galiza ²	1993	11,8 - 53,4*	Porte <i>et al.</i> , 2000 a b
Ostras				
<i>Crassostrea sp.</i>	Baía da Biscaia		31,7 - 218, 2	Orbea <i>et al</i> 2002
<i>C. gigas</i>	Baía de São Francisco		37 - 1380*	Oros e Ross 2005
	Coreia	1999-2000	29 - 133*	Yim <i>et al.</i> , 2002
	Delta do Ebro	1990	148 ^c	Solé <i>et al.</i> , 1994
	Delta do Ebro	1990	20 - 50 ^b	Solé <i>et al.</i> , 2000b
<i>C. virginica</i>	Baía de Chesapeake		15,35 ^a	Pittinger <i>et al.</i> , 1985
	Golfo do México		0,02 - 18,62 ^a	NOAA, 1995
	Terminos Lagoon (México)		494 - 8500*	Norena-Barroso <i>et al.</i> , 1999
<i>Ostrea edulis</i>	Delta do Ebro	1990	344 ^c	Solé <i>et al.</i> , 1994
	Delta do Ebro	1990	10 - 220 ^b	Solé <i>et al.</i> , 2000b
<i>Pinctada radiata</i>	Golfo Pérsico	2000-2001	3,12 - 23*	Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccostrea cucullata</i>	Golfo Pérsico	2000-2001	1,2 - 9,2*	Tolosa <i>et al.</i> , 2005
Mexilhões				
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Fontes hidrotermais	2002	132 - 444	Serafim <i>et al.</i> , 2008
<i>Mytilus spp</i>	Coreia	1999-2000	34,4 - 289*	Yim <i>et al.</i> , 2002
<i>M. californianus</i>	Baía de São Francisco		4,2 - 219*	Oros e Ross 2005
<i>M. edulis</i>	Baía de Dorchester, Massachusetts		413*	Peven <i>et al.</i> , 1996
	Dinamarca	1985	10-111 (16) [§]	Granby e Spliid, 1995
	Galiza		22 - 270	Solé, 2000 a
	Galiza ²	1993	5,5 - 61,42*	Solé <i>et al.</i> , 1996
	Galiza ²	1993	5,5 - 9,26*	Porte <i>et al.</i> , 1996
	Galiza ²	1993	9,4 - 270*	Porte <i>et al.</i> , 2000 a b
	Mar Báltico		18,5 - 72,2*	Baumard <i>et al.</i> , 1999 b
	Mar Báltico		76*	Broman <i>et al.</i> , 1990
	Mar Báltico; Suécia		0,04 - 6,2 ^a	Näf <i>et al.</i> , 1994
	Mar do Norte	1993-1994	8,6 - 12,5*	Solé <i>et al.</i> , 1998
	Mar do Norte		4 - 16	Solé, 2000 a
	Northern Irish Sea-loughs	2000	19 - 36,8*	Guinan <i>et al.</i> , 2001
	Perth, Austrália	1991	1-12	Burt e Ebell, 1995
	Yakina Bay (Oregon)		140 - 1320*	Mix e Schaffer, 1983
<i>M. galloprovincialis</i>	Baía de Arcachon, França		8 - 484*	Baumard <i>et al.</i> , 1999 b
	Baía de Arcachon, França	1995-1996	55,8 - 484*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 a
	Baía da Biscaia	1996-1997	21 - 64,3	Orbea <i>et al.</i> , 2002
	Baía da Biscaia	1991-1992	110 - 1630	Orbea <i>et al.</i> , 1999
	Barcelona		1700 - 4200	Solé <i>et al.</i> , 1995 b
	Barcelona	1989	2700 ^b	Porte <i>et al.</i> , 1991
	Costa Catalã		190-5490	Porte e Albaigés, 1993
	Delta do Ebro	1990	235 ^c	Solé <i>et al.</i> , 1994

Tabela 1.4 – Concentração de PAHs em várias espécies de moluscos e locais do mundo.

Espécie	Local	Data	PAH (ng/g ph)	Referência
	Delta do Ebro	1990	1100 - 2100	Solé <i>et al.</i> , 1995 a
	Delta do Ebro		1130 - 3400	Solé <i>et al.</i> , 1995 b
	Delta do Ebro	1990	70 - 150 ^b	Solé <i>et al.</i> , 2000b
	Delta do Ebro	1989	100 ^b	Porte <i>et al.</i> , 1991
	Galiza	1995	21 - 203	Porte <i>et al.</i> , 2001 a
	Galiza ³	2003	4,2 - 1556*	Soriano <i>et al.</i> , 2006
	Galiza ³		70 - 3500	Laffon <i>et al.</i> , 2006
	Golfo de Thermaikos, Grécia		34 - 150*	Kilikidis <i>et al.</i> , 1994
	Mar Báltico (Alemanha; Polónia)		17,4 - 776*	Baumard <i>et al.</i> , 1999 a
	Mar Ligurian, Itália		0,4 - 60*	Piccardo <i>et al.</i> , 2001
	Mar Negro, Crimeia		20 - 750	Shchekaturina <i>et al.</i> 1995
	Mediterrâneo		19 - 2675	Solé, 2000 a
	Mediterrâneo (Biomar I)		5,12 - 78*	Baumard <i>et al.</i> , 1999 b
	Mediterrâneo (Biomar II)		5 - 67,4*	Baumard <i>et al.</i> , 1999 b
	Mediterrâneo (W França, Córsega, Sardenha), Costa Espanha	1995	5,12 - 78*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 d
	Mediterrâneo, Espanha	2003	1,4 - 78*	Zorita <i>et al.</i> , 2007
	Mediterrâneo, Espanha	1996	12 - 405	Porte <i>et al.</i> , 2001 b
	Mediterrâneo, Espanha	1996	5 - 16,4*	Baumard <i>et al.</i> 1998 b, c
	Mediterrâneo, França	2003	5,2 - 62,4*	Zorita <i>et al.</i> , 2007
	Mediterrâneo, França	1996	7,8 - 15,9*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 b, c
	Mediterrâneo, França	1999-2001	nd - 183*	Bodin <i>et al.</i> , 2004
	Mediterrâneo, Itália	2003	7,4 - 326*	Zorita <i>et al.</i> , 2007
	Noruega		498*	Utvik 1999, Utvik <i>et al.</i> , 1999
	NW Portugal	2005	24,8 - 109,8* ^a	Lima <i>et al.</i> , 2007
	NW Portugal	2005	4 - 69,2	Lima <i>et al.</i> , 2008
	Porto de Arcachon, França	1995-1996	96,6*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 a
	Porto de Barcelona	1996	67,2*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 b, c
	Porto de Vendres, França	1996	67,4*	Baumard <i>et al.</i> , 1998 b, c
	Saudafjord, Noruega		345,8* ^a	Naes <i>et al.</i> , 1995
	Sul de Portugal	1996-1997	145 - 5035 (651) [§]	(esta tese)
	Sul de Portugal	2003	375 - 887 (516) [§]	(esta tese)
	Sul de Portugal	2003	375 - 874	Bebianno <i>et al.</i> , 2007
	Sul de Portugal	2003	460 - 874	Serafim <i>et al.</i> , 2008
	Veneza	1995	20 - 1800*	Wetsel e Van Vleet 2004
	Veneza		17 - 139	Solé, 2000 a
	Veneza	1993	18,2 - 100,8*	Solé <i>et al.</i> , 2000 ^a
<i>M. trossulus</i>	Porto de Halifax, Canadá	2003	14 - 188*	Yeats <i>et al.</i> , 2008
	Prince William Sound, Alasca ⁴		18,5* ^a	Varanasi <i>et al.</i> , 1990
	Prince William Sound, Alasca ⁴	1991	2,6 - 12642*	Page <i>et al.</i> , 2005
	Prince William Sound, Alasca ⁴	2001	2,2 - 119,2*	Page <i>et al.</i> , 2005
<i>Perna perna</i>	Costa Marroquina	2000-2001	1 - 70*	Azdi <i>et al.</i> , 2006
Outros				
<i>Pinna muricata</i>	Golfo Pérsico	2000-2001	12,5*	Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Sondylus sp (vieira)</i>	Golfo Pérsico	2000-2001	8,7*	Tolosa <i>et al.</i> , 2005
<i>Yoldia eightsi</i>	Ilhas Signy, Antártico	1988-1989	5,3 - 17,6	Cripps e Prindle, 1995

* - valores em peso húmido, calculados a partir dos dados originais publicados em peso seco, assumindo uma proporção 5:1; § - valores da mediana entre parêntesis 1 - *Estrella Pampeana*, Jan 1999, 1000 ton oil; 2 - *Aegean Sea*, Dez 1992, 79000 ton light crude oil (tipo Brent); 3 - *Prestige*, Nov 2002, 77000 ton heavy fuel oil; 4 - *Exxon Valdez*, Mar 1989, 35,500 ton Alaskan North Slope (ANS); a - µg/g ph; b - ng/g ph equivalentes de criseno; c - µg /g lípidos equivalentes de criseno

1.2.2 – Toxicidade e efeitos sub-letais

Os hidrocarbonetos têm efeitos tóxicos a vários níveis moleculares, celulares e bioquímicos (alterações do metabolismo normal, alterações do ADN), interactivos, relacionados com a sua metabolização, após incorporação pelo organismo, fisiológicos a nível do organismo (redução na taxa de crescimento e reprodução), populações e ecossistemas. A presença hidrocarbonetos no meio marinho tem sido associada ao aparecimento de neoplasias no fígado de algumas espécies de peixes (Krahn *et al.*, 1996), à atrofia e necrose do epitélio diverticular na ostra *Crassostrea virginica* (Gold-Bouchot, *et al.*, 1995), a danos nas células da glândula digestiva, como a vacuolização, atrofia ou destruição do epitélio, nos moluscos bivalves *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis* e *C. gigas* (Moore, 1985, 1988). Danos nas brânquias, gónadas, tecido intersticial e hiperplasia dos rins foram também detectados na amêijoia *Mya arenaria*, que em casos muito acentuados pode levar à morte. Pode também levar à redução da latência das enzimas hidrolíticas lisossomais das células digestivas de vários moluscos (Lowe *et al.*, 1981; Lowe, 1988; Lowe e Clark, 1989). Este tipo de compostos também podem alterar o funcionamento normal do sistema endócrino, interferir com os processos enzimáticos e induzir alterações na estrutura celular.

A presença de hidrocarbonetos no meio marinho tem um efeito indutor na resposta metabólica e de biotransformação, sendo o seu aumento passível de quantificação. A indução do sistema enzimático responsável pelo metabolismo dos hidrocarbonetos visa a transformação dos produtos acumulados noutros excretáveis, por forma a diminuir o seu efeito tóxico e reduzir o seu conteúdo nos tecidos. As alterações entre a taxa de entrada dos compostos e a sua metabolização, pode promover ora a acumulação dos compostos ora a sua eliminação. A quantificação das enzimas responsáveis pelo

metabolismo dos PAHs tem sido utilizada como indicadora de exposição a este tipo de compostos.

1.2.3 - Metabolismo e biotransformação dos PAHs

A bioacumulação ocorre quando as taxas de entrada do composto no organismo são superiores às taxas de excreção. Muitos compostos lipofílicos acumular-se-iam quase indefinidamente se o organismo não possuísse meios de os transformar em metabolitos mais solúveis capazes de serem excretados (Di Giulio *et al.*, 1995).

De um modo geral, a biotransformação é a conversão dos compostos orgânicos lipofílicos pelos sistemas enzimáticos noutros mais polares, hidrofílicos e solúveis (Di Giulio *et al.*, 1995), de modo a reduzir o tempo de meia-vida biológica dos compostos e evitar a sua acumulação (Vermeulen, 1996). A biotransformação dos compostos ocorre em todos os órgãos e tecidos embora o fígado (nos vertebrados), o hepatopâncreas (nos crustáceos) e a glândula digestiva (nos bivalves) sejam os órgãos desintoxicadores por excelência (Di Giulio *et al.*, 1995). As reacções de biotransformação podem ser divididas em três tipos (ou fases) de reacções bioquímicas. As *reacções da fase I* incluem reacções de oxidação, redução e hidrólise, de modo a revelar ou introduzir um grupo funcional ou reactivo nas moléculas dos compostos (Vermeulen, 1996). A sua função principal é converter os compostos em espécies mais polares ou hidrofílicas, e portanto, mais susceptíveis de entrar nas rotas metabólicas (Timbrell, 2003). As *reacções da fase II* envolvem a conjugação do composto ou dos metabolitos resultantes da fase I com constituintes celulares polares tais como o ácido glucurónico, sulfato inorgânico, aminoácidos ou glutations. As reacções de conjugação formam conjugados altamente solúveis em água, geralmente não tóxicos, ionizáveis e facilmente excretáveis

através da bÍlis, rins ou brânquias (Buhler e Williams, 1989; Moore *et al.*, 1989; Porte *et al.*, 1991; Livingstone, 1992; Di Giulio *et al.*, 1995, Vermeulen, 1996). O metabolismo da fase III constitui o metabolismo futuro dos metabolitos da fase II. As reacções da fase III são catalizadas por enzimas que também estão activas nas reacções da fase I e/ou fase II. Basicamente as reacções da fase III diferem das das fases I e II somente pelo facto de que os substratos são produtos prÉvios das reacções metabÓlicas I e II (Vermeulen, 1996). Deste modo, a partir do momento da entrada no organismo (Fig. 1.8), podem ocorrer diversas situações: (1) o composto pode ser armazenado se não for metabolizÁvel nem activo, do ponto de vista toxicolÓgico, normalmente em ligação com lípidos; (2) a forma tÓxica do composto pode interagir com macromolÉculas endÓgenas, como o ADN ou proteÍnas, ou com estruturas como as membranas, o que origina

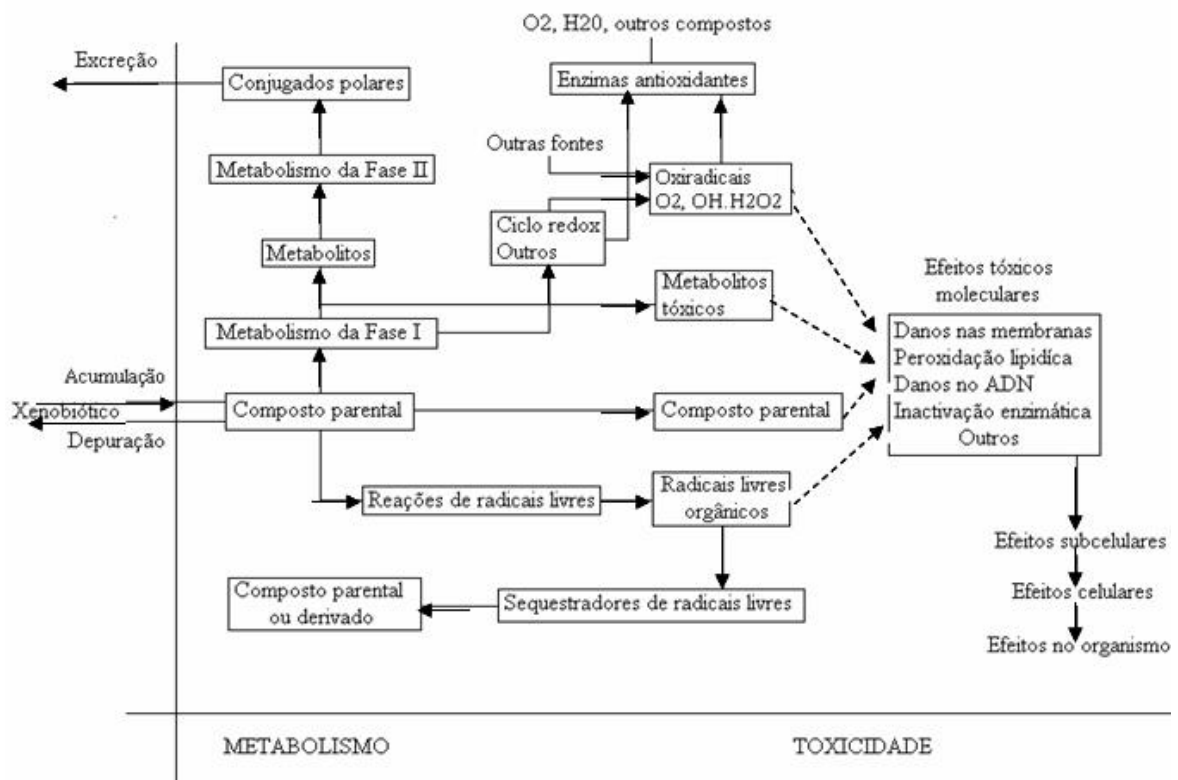


Figura 1.8 - Principais vias de biotransformação, desintoxicação e toxicidade, e os resultantes efeitos moleculares, dos compostos orgânicos xenobióticos nos animais (as setas a tracejado representam os efeitos moleculares tÓxicos) (Adaptado de Livingstone, 1991a)

manifestações de toxicidade; (3) pode sofrer a transformação, de modo a facilitar a sua excreção, podendo neste processo ocorrer a activação do composto, durante a qual se formam metabolitos tóxicos; e por último (4) o composto pode ser excretado sob a forma química original ou sob a forma de produto resultante de biotransformação (Livingstone, 1991a).

Os PAHs são compostos orgânicos altamente acumuláveis, uma vez que apresentam uma estrutura hidrofóbica. Esta característica faz com que estes compostos tenham uma taxa de eliminação reduzida, potenciando a sua acumulação nos tecidos (van der Oost *et al.*, 2003). Os PAHs acumulam-se preferencialmente nos lípidos, e por conseguinte nos órgãos com mais teor lipídico, como o fígado (peixes), hepatopâncreas (crustáceos) ou glândula digestiva (bivalves). No entanto, os PAHs, ao entrarem no organismo estão sujeitos a metabolismo. O primeiro passo no metabolismo dos PAHs é mediado pelo citocromo P450 (CYP450), nas chamadas reacções de biotransformação ou metabolismo da fase I, que introduz um átomo de oxigénio aos PAHs, para os tornar mais excretáveis.

A biotransformação é considerada como um mecanismo protector que reduz a acumulação e a toxicidade dos xenobióticos, existindo no entanto, numerosos exemplos em que o produto das enzimas desintoxicantes é mais tóxico que o composto inicial, resultando na sua activação procancerígena. Um exemplo da activação enzimática bastante estudado é a biotransformação do benzo(a)pireno (BaP) (Fig. 1.9). O composto não é carcinogénico por si só mas requer activação enzimática, catalisada pelo sistema MFO. O CYP450 produz uma variedade de formas hidroxiladas e epóxidas, que por sua vez sofrem posteriores transformações (pelas enzimas da fase II acima mencionadas), de forma a facilitar a sua excreção.

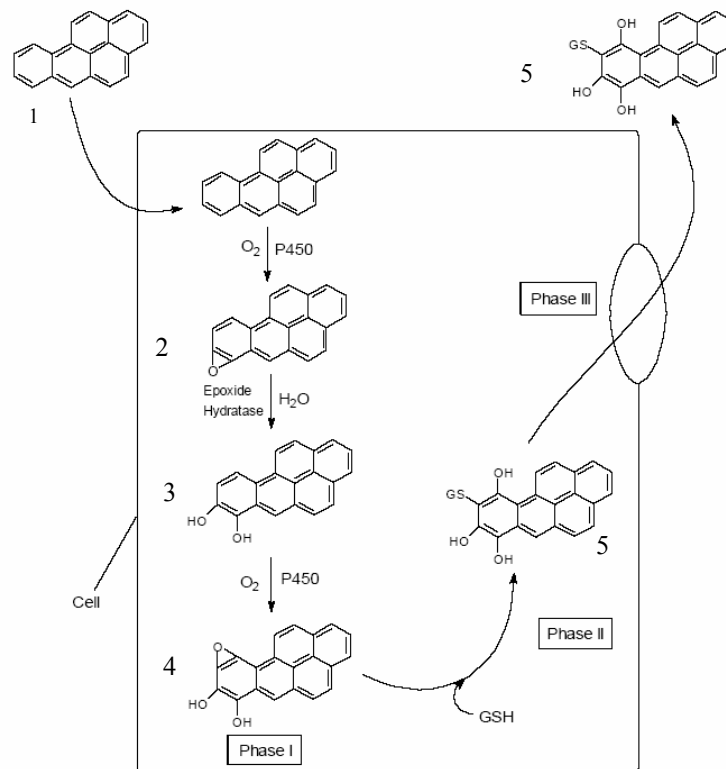


Figura 1.9 - Reacções de biotransformação do benzo(a)pireno. (Adaptado de Barreira, 2006). (1 – benzo(a)pireno (B(a)P); 2 – (+)BaP-7,8 epóxido; 3 – (-)trans-BaP-7,8 diol; 4 – (+)anti-BaP-7,8 dihidrodiol-9,10 epóxido; 5 – conjugação com a glutatona).

A activação do BaP nas suas formas cancerígenas é mediada pela isoenzima CYP1A1 e envolve duas epoxidações sequenciais nas posições 7,8 e 9,10 (passo 3 da Figura 1.8), com uma hidrólise intermédia do 7,8-epóxido pela enzima epóxido hidrolase (passo 2). Esta sequência produz um diol epóxido de BaP (passo 4), sendo esta a forma carcinogénica do BaP pois este metabolito pode formar ligações covalentes com a guanina do ADN resultando em pontos de mutação do ADN e subsequente activação oncogénica (Di Giulio *et al.*, 1995). Outros produtos gerados na biotransformação/activação dos xenobióticos, além dos metabolitos mutagénicos e carcinogénicos acima referidos, são os radicais livres de oxigénio: o radical anião superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidróxilo ($\cdot OH$).

1.4 – O citocromo P450 e o sistema MFO

Vários componentes são necessários para as reacções da fase I catalisadas pelo sistema MFO: este sistema é composto por duas enzimas principais - o citocromo P450 e a NADPH-citocromo P450 reductase. O citocromo b_5 e a NADH-citocromo b_5 reductase também podem participar nas reacções de monooxidação. Outros componentes necessários são o NADPH, o NADH, a membrana fosfolipídica e o oxigénio molecular. As reductases funcionam como dadores de electrões para o CYP450 durante as reacções de oxidação dos xenobióticos. Colectivamente, estes componentes controlam o ciclo catalítico monooxigenase onde um átomo de oxigénio molecular (O_2) é incorporado no composto, tornando-o mais solúvel (Fig.1.10).

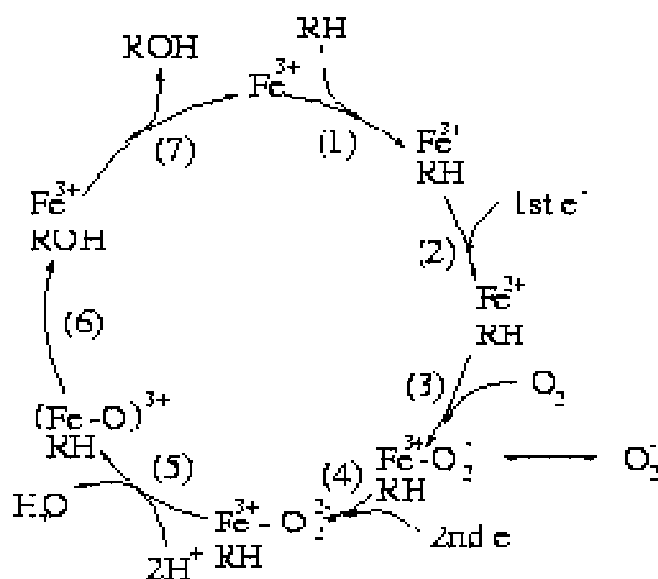
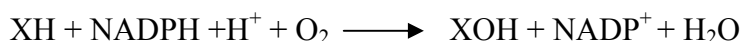


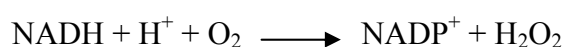
Figura 1.10 - Ciclo catalítico das reacções de monooxidação de um xenobiótico RH, com produto de reacção ROH, mediado pelo CYP450. Na 1ª etapa há a ligação do substrato com Fe oxidado do centro catalítico do cit P450 que altera o potencial redox e permite a transferência de electrões pela NADPH cit *c* reductase, reduzindo o Fe^{3+} a Fe^{2+} (2). Na 3ª etapa há a ligação do oxigénio molecular a outro ponto adjacente Fe. O complexo não é estável e facilmente autooxidável libertando o radical $O_2^{\cdot-}$. A reacção continua com a transferência do segundo electrão (4). O $O_2^{\cdot-}$ reage com protões do meio envolvente para formar H_2O a qual é libertada deixando uma forma de oxigénio activa (5) que pode reagir com o substrato (6) resultando numa forma hidroxilada do substrato (7). (Adaptado de Di Giulio *et al.*, 1995).

O citocromo P450

O citocromo P450 pertence a uma superfamília composta por uma grande quantidade de isoenzimas que constam de uma única cadeia polipeptídica, de pesos moleculares compreendidos entre os 45 e os 60 kDa e com uma Fe-protoporfirina IX (grupo hémico) como grupo prostético (Buhler e Williams, 1989; Goksøyr e Förlin, 1992), e absorvem a máxima quantidade luz nos 450 nm. Está presente numa grande variedade de organismos, desde bactérias até ao homem (Stegeman e Livingstone, 1998). O sistema MFO está envolvido numa variedade vias metabólicas de compostos endógenos e exógenos, e possui pelo menos três tipos diferentes de actividade. A primeira é a chamada *actividade monooxygenase*, que como resultado, e na presença de O₂ e do co-factor NADPH ou NADH, os compostos químicos inertes podem se submetidos a reacções de hidroxilação, epoxidação, N-, O- ou S- desalquilação, desaminação, sulfonização, desulfuração e dehalogenação (Di Giulio *et al.*, 1995). Estas reacções são executadas com uma estequiometria típica das reacções de oxidase função-mista (Vermeulen, 1996; Josephy, 1997).



A segunda actividade do sistema MFO é a libertação de espécies reduzidas de oxigénio, frequentemente chamada de *actividade oxidase*, a qual envolve uma transferência de electrões directa do citocromo P450 reduzido ao oxigénio molecular, com a concomitante formação do radical anião superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o radical hidróxilo (·OH). A reacção global é (Vermeulen, 1996):



A terceira actividade do sistema P450 é a *actividade reductase*, a qual ocorre em condições anaeróbias e envolve a transferência directa de electrões para substratos

reduzidos, tais como alcanos halogenados ou quinonas, para produzir radicais livres intermédios. As reacções redutoras processam-se melhor em condições (sub)celulares de baixa tensão de oxigénio, na presença de NADPH. Finalmente, as enzimas P450 podem funcionar como *peroxigenases* numa variedade de reacções de hidroxilação dependente de substrato peróxido (Vermeulen, 1996, Josephy, 1997).

O ferro hémico do CYP450 aceita um electrão de cada vez, enquanto que a NADPH e a NADH são dadores de 2 electrões. Assim, os electrões providenciados pelos nucleotidos de piridina para o grupo hémico deve passar através de um “transformador”, que aceita pares de electrões (na forma de anião hidreto H^-), mas que entrega um único electrão para o átomo de ferro. Esta função é providenciada por uma proteína com dois grupos de flavinas prostéticas, como a NADPH-citocromo P450 reductase (NADPH-red). Esta consiste num grande domínio citosólico que contém duas flavinas (FAD e FMN) como grupo prostético e um terminal N-peptido hidrofóbico que se fixa às proteínas das membranas. O fluxo de electrões passa da NADPH para a FAD ligada à reductase, depois para a FMN e finalmente para o citocromo P450 (Fig. 1.11) (Josephy, 1997) .

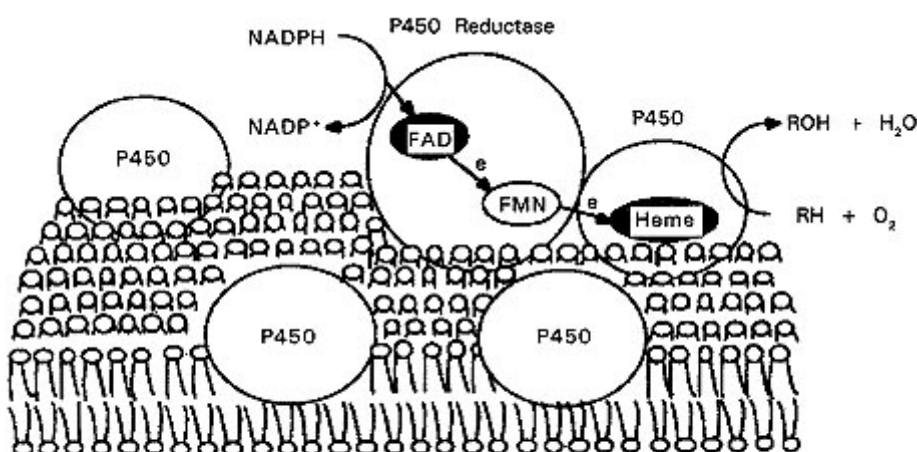


Figura 1.11 - Transporte de electrões para o CYP450, mediado pela NADPH-citocromo P450 reductase.

O citocromo b₅ e a NADH-citocromo b₅ reductase

O citocromo b₅ (Cit b₅) é uma heme-proteína que está presente nos microsomas do retículo endoplasmático, e pode servir como ligação na transferência de electrões entre a NADH e o citocromo P450, aumentando a capacidade catalítica de CYP450 (Porter 2002; Schenkman e Jansson, 2003). O citocromo b₅ está principalmente envolvido na biosíntese de lípidos, funcionando como dador de electrões para, no mínimo, três desaturases microsomais distintas, que sintetizam ácidos gordos, necessários para a fluidez da membrana. O Cit b₅ é também essencial na síntese de plasmalogeno e esteróis, no ciclo reprodutor, além de ser responsável pela redução da hemoglobina (Guengerich, 2005). O citocromo b₅ é reduzido por uma NADH- dependente de flavoproteína, a NADH-citocromo b₅ reductase (NADH-red), mas também pode ser reduzido pela NADPH-citocromo P450 reductase (Fig. 1.12). O citocromo b₅ funciona assim como um receptor/dador de electrões, recebendo um electrão do CYP450 reduzido, devolvendo-o seguidamente após ocorrer uma segunda redução do CYP450 e a ligação ao oxigénio (ocorre no passo 4 da figura 1.10).

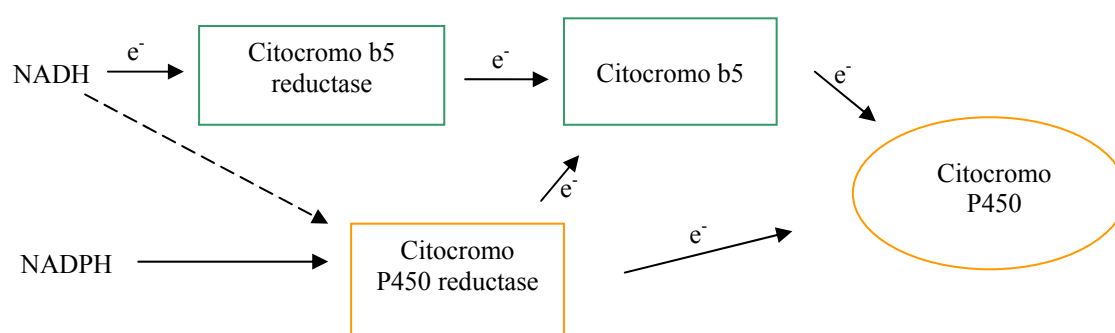


Figura 1.12 - Vias de transporte de electrões para o CYP450, no retículo endoplasmático (Adaptado de Porter, 2002).

O citocromo b₅ pode aumentar a capacidade catalítica do CYP450 por três vias: na transferência directa de electrões para o CYP450 (oxidação do CYP450 oxiferroso pelo citocromo b₅, uma reacção também conhecida como entrega do segundo electrão, mais rápido do que a CYP450 reductase) ou complexando com o CYP450 permitindo uma transferência dupla de electrões da NADPH-red numa única interacção com a reductase; pela redução da formação do anião superóxido e por acções directas que favorecem a formação de produtos sem alteração do potencial redox do citocromo b₅ (Schenkman e Jansson, 2003; Zang *et al.*, 2005).

1.5 – O citocromo P450 como biomarcador de exposição a hidrocarbonetos

Em geral, a concentração total de CYP450 e as actividades específicas (EROD, BPH) da sua isoforma CYP1A1 nos invertebrados é menor que nos peixes sendo particularmente baixa nos moluscos (Livingstone *et al.*, 1989). No entanto, a quantidade de CYP450 e a actividade do CYP1A1 pode ser induzida pela exposição a contaminantes como os PAHs (Livingstone e Farrar, 1984, 1985), envolvendo o aumento na transcrição do mensageiro ARN que codifica o CYP450. Como resultado da indução, a taxa de transformação química catalisada por este sistema é também aumentada (Di Giulio *et al.*, 1995). A indução do CYP450 em estudos de laboratório foi verificada em mexilhões expostos a óleos ou outros indutores de CYP450 (Livingstone *et al.*, 1985, 1997; Michel *et al.*, 1993, 1994) e em peixes. Stagg *et al.* (2000) estudaram os efeitos de determinados PAHs na expressão do mRNA de CYP1A1 e na actividade da EROD no fígado de salmão.

Em trabalhos de campo, também se verifica um aumento da concentração e das actividades dos componentes do sistema MFO em mexilhões recolhidos após derrames

de petróleo (Solé *et al.*, 1996), quer em programas de avaliação da qualidade ambiental (Porte *et al.*, 1991, Solé 2000 a; Bebianno *et al.*, 2007; Serafim *et al.*, 2008; Lopes e Bebianno, 2008). A indução e aumento da isoforma CYP1A1 e da actividade da benzo(a)pireno hidroxilase (BPH) foram detectadas em mexilhões, ostras e amêijoas (Solé *et al.*, 1994), assim como da actividade da EROD (transforma a etoxiresorufina em resofurina) em peixes (Corsi *et al.*, 2003; Lavado *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008) na presença ambiental de PAHs.

Pelo facto de a concentração do CYP450 e da actividade da sua isoforma CYP1A1 poderem ser induzidas na presenças de compostos orgânicos, foi proposto usar este sistema de desintoxicação como um biomarcador de exposição a hidrocarbonetos, de modo a avaliar o impacto destes contaminantes nos organismos marinhos (Rattner, *et al.*, 1989; Cajaraville *et al.*, 2000). Os biomarcadores devem, segundo Livingstone *et al.* (2000) 1) providenciar uma medição temporal e espacial integrada dos contaminantes biodisponíveis; 2) demonstrar a causa-efeito através dos processos subsequentes; 3) identificar a importância das diferentes vias de exposição pela aplicação a organismos de diferentes habitats e níveis tróficos; 4) detectar a exposição a compostos rapidamente metabolizáveis, como os PAHs; 5) ter o potencial de reflectir uma alteração em diferentes níveis de organização biológica, servindo como alertas prévios contra os efeitos ambientais dos contaminante. Assim, o citocromo P450, a sua actividade específica (BPH e EROD) e as restantes componentes do sistema MFO, têm sido utilizadas como biomarcadores de contaminação por hidrocarbonetos, quer após derrames de petróleo (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 b; Monteiro *et al.*, 2006) como em estudos de campo (Livingstone, 1988; Porte *et al.*, 2001 a,b; Livingstone *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2004; Coimbra *et al.*, 2004). Nestes estudos a variação da concentração de CYP450 mostrou responder às concentrações de PAHs

acumulados nos tecidos dos mexilhões, num gradiente de contaminação ambiental, devido aos derrames (no primeiro caso) e devido a fontes crónicas de contaminação, resultantes das actividades marítimas (no segundo caso).

Na Tabela 1.5 são apresentados níveis de CYP450 e restantes componentes do sistema MFO encontrados em varias espécies e locais.

Na costa Sul de Portugal poucos são os estudos sobre a utilização do citocromo P450 como biomarcador de exposição a produtos do petróleo (Bebianno *et al.*, 2007; Serafim *et al.*, 2008), embora a sua acumulação tenha sido avaliada na costa Sul de Portugal em mexilhões (Lopes *et al.*, 1999, 2000; Lopes e Bebianno, 2001) e em amêijoas *Ruditapes decussatus* (Barreira, 2006; Barreira *et al.*, 2007 b).

1.6 - Objectivos

Os moluscos bivalves, pela capacidade de acumular compostos orgânicos de natureza antropogénica nos seus tecidos, particularmente na glândula digestiva, são considerados mundialmente como bioindicadores de contaminação ambiental (Burns e Smith, 1981; Moore e Lowe, 1985; Bayne, 1989; Livingstone, 1991b; Venier e Canova, 1996; den Besten, 1998; Nasci *et al.*, 1999; Porte *et al.*, 2001), fazendo parte do programa “Mussel Watch” que teve início no ano de 1975 devido aos seus atributos (Golberg, 1975; Widdows e Donkin, 1992; Venier e Canova, 1996):

1 - os indivíduos do género *Mytilus* são membros dominantes das comunidades costeiras e estuarinas, quer do hemisfério Norte como do Sul, minimizando os problemas inerentes na comparação de dados;

2 - são sedentários e portanto melhores integradores de contaminação química que as espécies móveis, numa determinada área;

Tabela 1.5 - Concentração e actividades dos componentes do sistema MFO, e actividade da BPH (benzo(a)pireno hidroxilase) em várias espécies.

Espécie	Local	Cit 450 (pmol/mg prot)	"418" (u.a./mg prot)	NADPH-red (nmol/min/mg prot)	Cit b ₅ (pmol/mg prot)	NADH-red (nmol/min/mg prot)	BPH (u.a flu/mg prot)	Referência
Crustáceos								
crustáceos (várias espécies)		43-910		2-29	95		0,5-49	den Besten, 1998
crustáceos (várias espécies)		328					40	Livingstone, 1998
<i>Carcinus maenas</i>		n.d.		3,14±1,22		3,33±1,22		Livingstone, 1994
<i>Carcinus maenas</i>	Plymouth	223±85	31,6±13	4±0,4	35±1,7	22,5±0,8	38,3±5,2	Solé e Livingstone, 2005
<i>Procambarus clarkii</i>	Mediterrâneo	266±12	47,3±6,7	4,7±0,2	35±0,9	25,1±1,1	294±1,4	Solé e Livingstone, 2005
Peixes								
peixes (várias espécies)		322					30,7	Livingstone, 1998
<i>Platichthys flesus</i>				81,9±4,4		9,4±1,9		Livingstone, 1994
Equinodermes								
equinodermes (várias espécies)		63					8,4	Livingstone, 1998
<i>Asteria rubens</i>	Plymouth	50,5±6,2	4,5±1	10,6±1,1	67,8±14,5	341,6±56,7	24,7±1,3	den Besten <i>et al.</i> , 1990, 1998
<i>Echinus esculentus</i>	Plymouth	n.d.		5,6±1,9	70,1±15,8	26,1±13,7		den Besten <i>et al.</i> , 1990, 1998
<i>Holoturia forskali</i>	Plymouth	39,9±18,1		13±0,9	78,9±1,3	79,6±15	0,2	den Besten <i>et al.</i> , 1990, 1998
<i>Holoturia forskali</i>	Mediterrâneo	40,6±6,4	12,4±2,3	4,2±0,6	15,7±3,8	26,6±0,5	12,3±5,2	Solé e Livingstone, 2005
<i>Marthasterias glacialis</i>	Plymouth	75,7±7,2	3,7±1,4	12,4±5,7	40,8±1,3	44,1±12,8	9,1±1,8	den Besten <i>et al.</i> , 1990, 1998
Moluscos								
<u>Gastrópodes</u>								
<i>Buccinum undatum</i>	Plymouth	14±3,3	24,1±12	1,9±0,0	31,4±6,4	22,3±0,1	3,3±0,6	Solé e Livingstone, 2005
<i>Littorina littorea</i>		8-54		7,5-11,2	26-70			Livingstone, 1987
<i>Littorina littorea</i>		n.d.		7,5±0,4	26±2			Livingstone e Farrar, 1985
<i>Nucella palillus</i>	Plymouth	80±12	28,2±3	7,2±0,6	47,4±5,2	51,5±7,3	7,4±4,6	Solé e Livingstone, 2005
<i>Patella vulgata</i>	Plymouth	73,8±1	15±2,6	10,23±0,8	46±2,5	139±3,9	19,7±1,7	Solé e Livingstone, 2005
<u>Bivalves</u>								
bivalves (várias espécies)		3-134		4-15	26-160		10-37	den Besten <i>et al.</i> , 1998
bivalves (várias espécies)		73±10					21,2	Livingstone, 1990, 1998
bivalves (várias espécies)		8-134		4-22	26-160		3-35	Livingstone, 1991 a
<i>Arca zebra</i>		106		8,3	76			Stegeman, 1985
<i>Bathimodiolus azoricus</i>	Fontes hidrotermais	168 - 186	89-146	1,7-2	57-97	48-57		Serafim <i>et al.</i> , 2008
<i>Cardium edule</i>		20-85		5,3-10,6	80-94			Moore <i>et al.</i> , 1989
<i>Cerastoderma edule</i>	Plymouth	58,6±4	34,5±7,6	1,6±0,5	72,8±9,5	49,4±3,7	8,1±1,6	Solé e Livingstone, 2005
<i>Crassostrea gigas</i>		27,4±2,2		5,7±0,2	46,0±1,4			Solé <i>et al.</i> , 1994

Tabela 1.5 - Concentração e actividades dos componentes do sistema MFO, e actividade da BPH (benzo(a)pireno hidroxilase) em várias espécies.

Espécie	Local	Cit 450 (pmol/mg prot)	"418" (u.a./mg prot)	NADPH-red (nmol/min/mg prot)	Cit b ₅ (pmol/mg prot)	NADH-red (nmol/min/mg prot)	BPH (u.a flu/mg prot)	Referência
<i>Macrocalista maculata</i>		79		4	81			Stegeman, 1985
<i>Mya arenaria</i>	Plymouth	78,2±24	39,2±3,5	5,5±0,7	41,8±4,8	34,1±5,6	10±0,1	Solé e Livingstone, 2005
<i>Ostrea edulis</i>		24,4±2,2		4,6±0,4	52,4±5,0			Solé <i>et al.</i> , 1994
<i>Scrobicularia plana</i>	Plymouth	89±4,4	42,7±1,2	2,5±0,2	58,4±5,9	15±2,1	0,7±0,5	Solé e Livingstone, 2005
<i>Tapes semidecussatus</i>		47,4±3,3		12,4±0,9	45,9±4,5			Solé <i>et al.</i> , 1994
<i>Mytilus edulis</i>		47-134		10,3-15,4	26-76			Livingstone e Farrar, 1984
<i>M. edulis</i>	Galiza	46 - 83	10 - 20	14 - 16			52 - 78	Solé <i>et al.</i> , 1996
	Galiza	45,7 - 82,7	10,4 - 15,6	14 - 16				Porte <i>et al.</i> , 2000 b
	Galiza	45,9 - 58,8	14,9 - 20,8	11,5 - 13,3				Porte <i>et al.</i> , 2000 b
	Galiza	28,5 - 37,4	11,9 13,6	7,1 - 8,8				Porte <i>et al.</i> , 2000 b
	Mar do Norte	15,6-30,4	7,4-9,2				11,6-29,1	Solé <i>et al.</i> , 1998
	Mar do Norte	17 - 43	8-16				11-42	Solé, 2000 a
		47±14		54±22	26±2			Livingstone e Farrar, 1985
		n.d.		2,91±0,22		1,83±0,39		Livingstone, 1994
		101		8,1	37			Stegeman, 1985
<i>M. galloprovincialis</i>	Arcachon, França	51,5		21,8				Suteau e Narbonne, 1988
	Barcelona	68,6 ± 13,9	24,1 ± 4,8	19,3 ± 2,3	74,7 ± 16,9			Porte <i>et al</i> 1991
	Delta do Ebro	56,2±5,1	18,2±1,2	24,9±1,6	54,2±2,1			Solé <i>et al</i> 1994
	Delta do Ebro	47,7 ± 7,2	17,9 ± 1,2	16,4 ± 2,5	63,1 ± 5,6			Porte <i>et al</i> 1991
	Delta do Ebro	41 - 86	16 - 29	8-25	40 - 62			Solé <i>et al.</i> , 1995a
	Delta do Ebro	30 - 70	14 - 27	8-19	50 - 90			Solé <i>et al.</i> , 1995b
	Galiza	43 - 83	10-20	14-16			45 - 78	Solé, 2000 a
	Galiza	43 - 67	15 - 18				44 - 63	Porte <i>et al.</i> , 2001 a
	Mediterrâneo	40 - 80	14 - 27	8-25			80-135	Solé, 2000 a
	Mediterrâneo	56 - 86	20 - 25	20 - 25			76 - 266	Porte <i>et al.</i> , 2001 b
	Sul de Portugal	15,1 - 65,3	2,6 - 11,7	3,1 - 15,8	7,9 - 38,1	16,3 - 127,2		(esta tese)
	Sul de Portugal	46,1 - 69,5	6,4 - 16,1	5,9 - 16,4	14,1 - 78,3	19,1 - 68,9		(esta tese)
	Sul de Portugal	46,3 - 78,2						Bebianno <i>et al.</i> , 2007
	Sul de Portugal	61,7 - 80,0	10-16	11-14	42-86	58-114		Serafim <i>et al.</i> , 2008
	Veneza	24-66	8-33				43 - 82	Solé, 2000 a
	Veneza	24-57	8-12				51-82	Solé <i>et al.</i> , 2000a
	Veneza	56-66	27-33					Livingstone <i>et al.</i> , 1995

3 - são relativamente tolerantes a grandes variações das condições ambientais, incluindo níveis moderadamente elevados de muitos tipos de contaminantes;

4 - são filtradores e concentram muitos compostos químicos nos seus tecidos, com um factor de bioacumulação de 10 a 10^5 . Este facto por vezes facilita a quantificação de contaminantes em traço nos seus tecidos comparativamente com a água;

5 - a quantificação de compostos químicos nos tecidos dos bivalves providencia-nos uma avaliação da biodisponibilidade, a qual não é aparente a partir da quantificação dos contaminantes nos compartimentos ambientais (água, partículas em suspensão e sedimento);

6 - comparativamente aos peixes e crustáceos, os bivalves têm menores níveis de actividade dos sistemas enzimáticos capazes de metabolizar contaminantes orgânicos. Assim, as concentrações dos contaminantes nos tecidos dos bivalves reflectem com maior precisão a magnitude da contaminação ambiental;

7 - as populações de mexilhões são relativamente estáveis e são suficientemente grandes para amostragens sucessivas, permitindo obter variações temporais nos níveis de contaminação a curto e a longo prazo;

8 - podem ser rapidamente transplantados e mantidos em gaiolas em locais de interesse, tanto em zonas intertidais como subtidais, onde as populações não se desenvolvem normalmente por inexistência de substratos adequados;

9 - os mexilhões são uma espécie comercialmente importante a nível mundial, e a quantificação de contaminação química tem interesse no que diz respeito à saúde pública.

A exposição crónica dos organismos marinhos a concentrações subletais de contaminantes, como compostos do petróleo (alifáticos e aromáticos), tem vários

efeitos a longo prazo, como sejam a sua acumulação nos tecidos, a redução do potencial de crescimento, interferências na alimentação e na reprodução e alterações de comportamento, sendo geralmente os indivíduos jovens mais sensíveis que os adultos (Libes, 1991; GESAMP, 1993). Muitos compostos orgânicos são potencialmente cancerígenos, podendo constituir uma ameaça tanto para as espécies em questão como para o homem (USEPA, 1976; Libes, 1991; GESAMP, 1993).

As zonas portuárias e a influência de descargas de origem urbana constituem fontes crónicas de poluição por compostos orgânicos de natureza antropogénica, tendo por vezes consequências importantes a longo prazo, uma vez que os organismos estão permanentemente expostos a concentrações subletais destes produtos, provocando não só alterações fisiológicas nos indivíduos como também alterações nas suas características organolépticas. Ao longo da costa Sul de Portugal consideram-se fontes crónicas de hidrocarbonetos as zonas que sofrem o impacto de marinas e de portos de pesca ou comerciais, normalmente situados perto de centros populacionais, onde a influência dos esgotos urbanos também se faz sentir. Por outro lado, a proximidade dos esquemas de separação de tráfego marítimo à costa e o tráfego costeiro relacionado com as actividades de pesca e turismo, podem ser fontes crónicas de hidrocarbonetos de petróleo.

Deste modo, pretende-se com esta dissertação avaliar os níveis de compostos orgânicos de natureza antropogénica nomeadamente hidrocarbonetos do petróleo (alifáticos e aromáticos policíclicos) e os seus efeitos, nos mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos ao longo da costa Sul de Portugal em locais com diferentes graus de contaminação. As zonas de amostragem abrangem áreas com um marcado impacto populacional e industrial, com o conseqüente tráfego marítimo resultante das actividades comerciais, de pesca, e de recreio. São portanto zonas com um nível de

contaminação crónica importante. Foram também seleccionados locais onde os níveis de contaminação são menores, de modo a servir como uma área de referência.

Esta dissertação inicia-se com o presente Capítulo, onde se apresenta a composição e as principais características dos hidrocarbonetos do petróleo e se caracterizam as fontes, fazendo referência aos derrames ocorridos em Portugal. Caracteriza-se o comportamento do óleo no mar após um derrame e o destino dos compostos, evidenciando o seu potencial de acumulação nos tecidos e aos seus efeitos tóxicos e subletais. Foi também descrito o mecanismo de desintoxicação que os organismos possuem na presença de hidrocarbonetos, sendo estas reacções de monooxidação mediadas pelo sistema MFO dependente do CYP450, que visa biotransformar e excretar os compostos, de modo a proteger o organismo dos seus efeitos.

No Capítulo 2 é descrita a recolha das amostras e são descritos os métodos analíticos utilizados para a quantificação e identificação dos hidrocarbonetos do petróleo (alifáticos e aromáticos) acumulados nos tecidos dos mexilhões. Inclui-se ainda a metodologia para a análise bioquímica dos componentes do sistema MFO. Refere-se ainda os métodos estatísticos utilizados.

No Capítulo 3 apresenta-se a variação espacial, sazonal e temporal da fracção dos hidrocarbonetos alifáticos (*n*-alcanos, isoprenoides e UCM), acumulados em mexilhões recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. A avaliação da origem e tipo desta contaminação é avaliada por marcadores químicos.

No Capítulo 4 analisa-se a fracção dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) nos tecidos dos mexilhões. A variação sazonal e espacial é também avaliada, com o objectivo de caracterizar o grau de contaminação quer em termos de concentração total como em termos de PAHs individuais. A origem e possíveis fontes destes

hidrocarbonetos na costa Sul de Portugal, são identificadas tanto por razões diagnóstico entre isómeros de PAHs, como pela comparação com “assinaturas” típicas.

Após a exposição a contaminantes orgânicos, os organismos tendem a metabolizar estes compostos em formas mais ou menos solúveis e excretáveis. O primeiro passo na metabolização destes compostos é mediado pelo sistema monooxigenase de função mista, dependente do CYP450. A indução dos componentes do sistema MFO tem sido usada como biomarcador de exposição a compostos orgânicos, uma vez que as concentrações do sistema MFO reflectem as concentrações de PAHs do meio (Livingstone, 1988, Porte *et al.*, 1991, Solé *et al.*, 1995, Porte *et al.*, 2001 ab). Deste modo, no Capítulo 5 analisa-se a variação dos componentes do sistema MFO na glândula digestiva dos mexilhões, e avalia-se a relação entre o CYP450 e os teores de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos acumulados na parte edível dos mexilhões.

Uma forma de confirmar (ou não) a relação entre a exposição a contaminantes e a capacidade de resposta dos biomarcadores é a exposição em laboratório em condições controladas. No entanto, estas não reproduzem completamente as características ambientais reais. Nos últimos anos, foi considerada a importância de integrar a componente ambiental quando se avalia o efeito do composto tóxico nos organismos. Assim, no Capítulo 6 foi aplicado o conceito da biomonitorização activa (BA), na qual organismos de um local “limpo” são transplantados para um local mais contaminado, e *vice-versa*, permitindo o estabelecer relações causa-efeito entre a acumulação de contaminantes e os seus efeitos em condições ambientais reais (Viarengo *et al.*, 1995; Nasci *et al.*, 1999, Roméo *et al.*, 2003 a, b). Nesta experiência, a bioacumulação e depuração das concentrações dos hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) foram avaliados, assim como os seus efeitos ao nível dos componentes do sistema MFO, de forma a compreender a metabolização destes compostos nos mexilhões. Por fim, no

Capítulo 7 é apresentada a discussão geral, na qual se relaciona as concentrações e principais origens dos hidrocarbonetos do petróleo na costa Sul de Portugal, e as suas relações com o sistema MFO, no mexilhão *M. galloprovincialis*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – RECOLHA DE AMOSTRAS

Amostras de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (5 a 6 cm de comprimento; $n=100$) foram recolhidas em 8 locais da costa Sul de Portugal: Sagres (SG), Lagos (LG), Portimão (PT), Vilamoura (VM), Faro (FR), Olhão (OL), Tavira (TV) e Vila Real de Santo António (VRSA) (Fig. 2.1), em situação de baixa-mar durante as marés-vivas (infralitoral) e foram transportados vivos para o laboratório. Após 24 horas de depuração, os organismos seleccionados para as análises químicas ($n=50$) foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os organismos destinados às análises bioquímicas ($n=50$) foram dissecados e as glândulas digestivas congeladas em azoto líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à análise.



Figura 2.13 – Locais de amostragem de *M. galloprovincialis* na costa Sul de Portugal.

2.2 - ANÁLISES QUÍMICAS

2.2.1 - Material de vidro

O material de vidro utilizado em todas as análises químicas foi previamente descontaminado durante 15 minutos num banho de ultra-sons (Selecta), com 5 litros de

capacidade, usando um detergente alcalino a 5%, EXTRAN AP 13 (Merck, Alemanha), lavando-se posteriormente com água destilada. Foi posteriormente lavado com acetona, envolto em papel de alumínio e colocado na estufa a 50 °C. As pipetas Pasteur e todo o material a ser pesado (vials) foram deixados 12 horas em mufla a 450 °C. Foram guardados até à sua utilização envoltos em papel de alumínio.

2.2.2 - Solventes e adsorventes

Os solventes (grau de pureza para análise vestigial) foram adquiridos à Merck com excepção do *n*-hexano que foi purificado no laboratório por destilação de fraccionamento com uma coluna Dufton. A pureza final foi confirmada por GC-FID Perkin-Elmer “AutoSystem XL”. O *iso*-octano e o acetonitrilo utilizados tinham grau de pureza para análise vestigial em GC e HPLC. A água usada foi de qualidade Milli-Q. O sulfato de sódio anidro, a sílica-gel (40-60 µm mesh) e a alumina (70-230 µm mesh) foram a activar a 350, 120 e 350 °C, respectivamente, durante 8 horas.

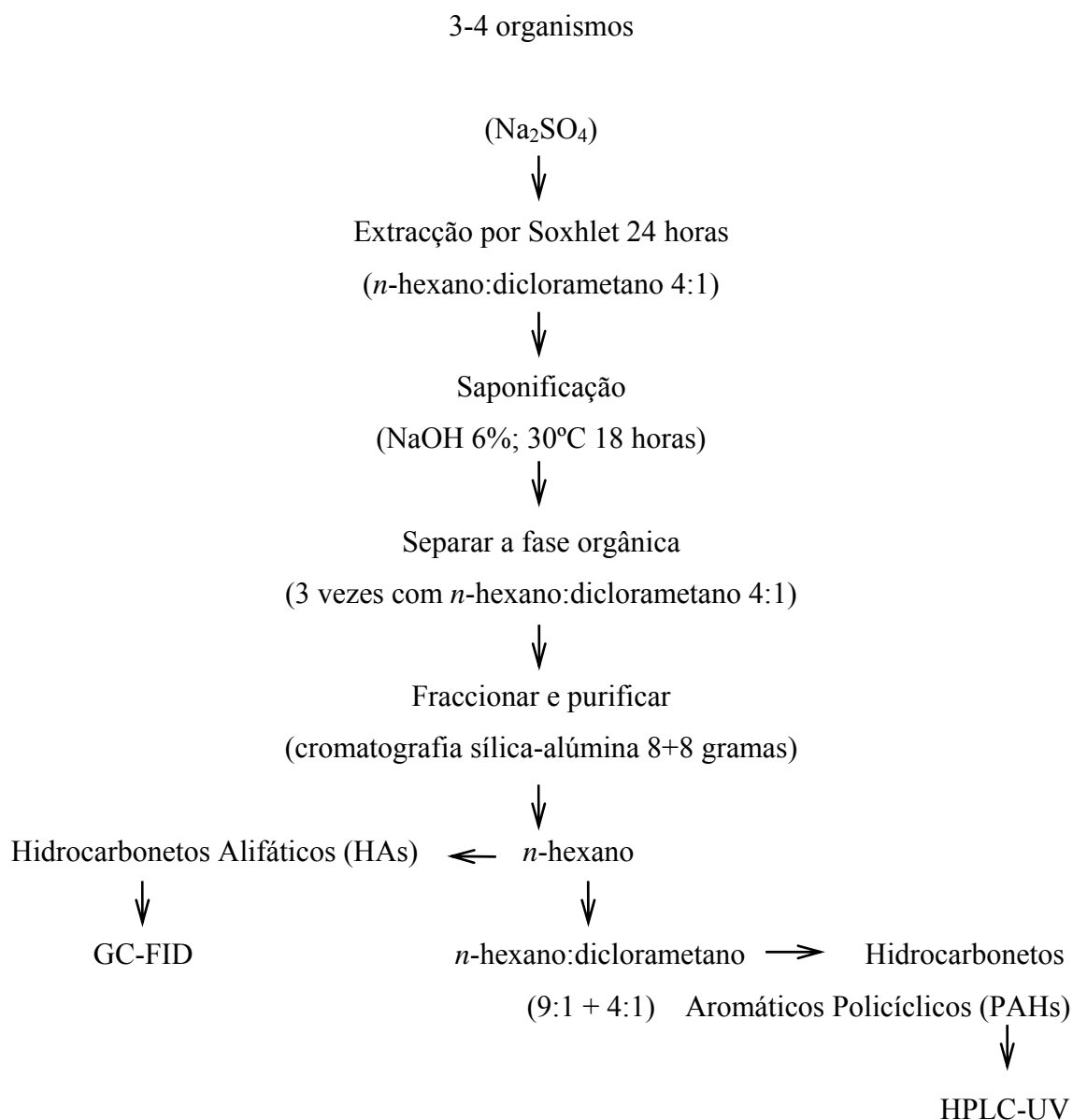
2.2.3 - Extracção e fraccionamento

Os hidrocarbonetos do petróleo foram extraídos em triplicado em amostras compostas de 3 a 4 mexilhões (\pm 8 gramas), que foram descongeladas à temperatura ambiente, mantendo os organismos apoiados na concha de modo a que o líquido intervalvar escorresse. Os tecidos foram separados das conchas e pesados, macerados com sulfato

de sódio anidro (Na_2SO_4) até se formar um pó solto. O macerado foi extraído em Soxhlet com 250 ml de uma solução de *n*-hexano:diclorometano (4:1) durante 24 horas. Após arrefecer à temperatura ambiente o volume do extracto foi concentrado até cerca de 30 ml num rotavapor Büchi R.114 acoplado a um banho Waterbath B48. O extracto foi transferido para tubos de rosca de 100 ml e saponificado com 10 ml de NaOH a 6%, num banho-maria a 30 °C, durante 18 horas. A fase orgânica foi separada da fase aquosa com 3 lavagens de *n*-hexano:diclorometano (4:1). O volume final da fase orgânica foi concentrada no rotavapor e posteriormente evaporada à secura com um jacto suave de azoto, num banho quente (30°C) (Thermolyne Type 17600 Dri-Bath), sendo ressuspensa em 10 ml de *n*-hexano.

Seguidamente procedeu-se à purificação e fraccionamento da amostra por cromatografia de adsorção, utilizando colunas (30 cm comprimento e 1 cm diâmetro interno) de sílica gel-alúmina (40-60 μm e 70-230 μm , respectivamente) (8g + 8g) em *n*-hexano, activadas a 120 e 450 °C, respectivamente. A fracção da amostra que contém os hidrocarbonetos alifáticos (HA) (fracção 1) foi eluída com 50 ml de *n*-hexano, e a fracção que contém os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (fracção 2) foi eluída com 25 ml de *n*-hexano-diclorometano (9:1) e 25 ml de *n*-hexano-diclorometano (4:1). As duas fracções recolhidas foram concentradas até aproximadamente 1 ml e posteriormente evaporadas à secura com azoto, num banho quente. A fracção dos hidrocarbonetos alifáticos foi diluída em 300 μl de *iso*-octano (Merck) e a dos aromáticos policíclicos em 300 μl de acetonitrilo (Merck).

Esquemáticamente, o procedimento foi o seguinte:



2.2.4 – Análise e quantificação dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs)

Os hidrocarbonetos alifáticos foram analisados por cromatografia de gasosa (GC) com um detector de ionização de chama (FID). Foi utilizado um cromatógrafo Perkin-Elmer “AutoSystem XL” com um injetor automático. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280 e 330 °C, respectivamente, e o gás de arraste utilizado foi o hélio,

com um fluxo de $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Utilizou-se uma coluna do tipo DB5 (J&W, Scientific, USA) com uma fase estacionária de 5% fenil-metil-polisiloxano, com 30 metros de comprimento e diâmetro interno de 0,25 mm. O programa de temperaturas constava de uma rampa inicial de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 minuto, aumentando até $300 \text{ }^\circ\text{C}$ a $6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, que se manteve por 15 minutos. Os diferentes HAs foram identificados e quantificados através da comparação com os tempos de retenção dos HAs do padrão. O padrão de HAs é composto pelos *n*-alcanos C15, C16, C17, C18, C19, C22, C23, C24, C28, C32, C36 e pristano, diluídos em *iso*-octano em concentrações que oscilam entre 6,66 e $13,33 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Na Figura 2.2 está representado um cromatograma obtido para o padrão de HAs. A concentração de HAs das amostras de mexilhão é expressa em ng/g peso húmido (ng/g ph). Por cada conjunto de 5 amostras foi injectado um solvente (para limpar a coluna) e um padrão.

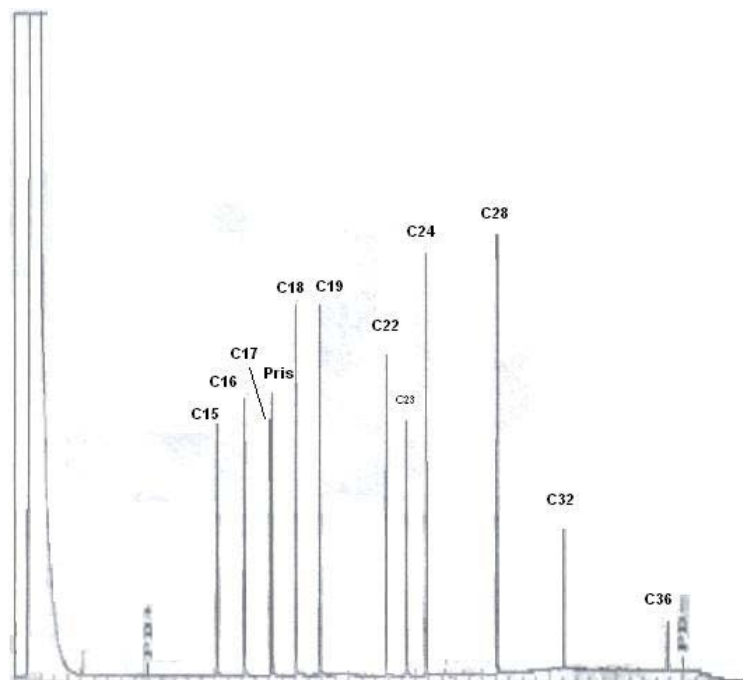


Figura 2.2 – Cromatograma do padrão de *n*-alcanos .

Os limites de detecção foram determinados calculando a quantidade de amostra necessária para obter um pico com 3 vezes a altura do ruído da linha de base dos cromatogramas (Lindsay, 1992) (Tab. 2.1). Ao longo do processamento das amostras, foram efectuados ensaios em branco, fazendo uma extracção de sulfato de sódio numa quantidade semelhante à das amostras, e analisados do mesmo modo. Não foram detectados HAs nos brancos. A reprodutibilidade foi assegurada pela análise de três replicados por cada amostra, cujo desvio padrão não excedeu os 25%.

Tabela 2.1 - Limites de detecção dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e aromáticos policíclicos (PAHs) analisados.

HAs		PAHs	
Composto	Limite de detecção (ng/g)	Composto	Limite de detecção (ng/g)
<i>n</i> -C ₁₄	0,2	Naftaleno	0,11
<i>n</i> -C ₁₅	0,2	Acenaftileno	0,13
<i>n</i> -C ₁₆	0,1	Acenafteno	0,24
<i>n</i> -C ₁₇	0,2	Fluoreno	0,02
<i>n</i> -C ₁₈	0,3	Fenantreno	0,01
<i>n</i> -C ₁₉	0,1	Antraceno	0,01
<i>n</i> -C ₂₂	0,2	Fluoranteno	0,02
<i>n</i> -C ₂₃	0,2	Pireno	0,02
<i>n</i> -C ₂₄	0,2	Benzo(a)antraceno	0,01
<i>n</i> -C ₂₈	0,1	Criseno	0,01
<i>n</i> -C ₃₂	0,2	Benzo(b)fluoranteno	0,01
<i>n</i> -C ₃₆	0,2	Benzo(k)fluoranteno	0,01
Pristano	0,1	Benzo(a)pireno	0,01
Fitano	0,1	Dibenzo(a,h)antraceno	0,06
		Benzo(g,h,i)perileno	0,03
		Indeno(123-cd)pireno	0,01

2.2.5 – Análise e quantificação dos PAHs

A análise e quantificação dos PAHs foi efectuada por HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Elevada Pressão) através do uso de uma bomba binária Spectra System

P2000, ligada a um detector Spectra System UV3000HR, acoplado a uma interface Spectra SystemSN4000, com um processador de dados ChromQuest Chromatography Data System. A coluna utilizada foi do tipo C-18 Lichrocart 250-3 Lichrospher PAH 5 µm (Merck) com pré-coluna Lichrocart 4-4 Lichrospher (Merck). Usou-se como eluentes água e acetonitrilo (a 50% durante 10 minutos) seguidos de acetonitrilo durante 35 minutos e de água e acetonitrilo a 50 % durante 3 minutos.

Os diferentes PAHs foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-Vis entre 200 e 450 nm, com o dos PAHs do padrão. O padrão utilizado contém uma mistura de 16 PAHs (EPA 610 PAH Mix, Sigma), constituído por naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3,cd)pireno. A quantificação dos PAHs individuais das amostras foi efectuada através da comparação com as áreas dos picos do padrão diluído 1:200 a 254 nm. Por cada conjunto de 5 amostras foi injectado um solvente (para limpar a coluna) e um padrão. A concentração dos diferentes PAHs é expressa em ng/g peso húmido (ng/g ph). Na Figura 2.3 está representado um cromatograma obtido para o padrão de PAHs. Os limites de detecção foram determinados calculando a quantidade de amostra necessária para obter um pico com 3 vezes a altura do ruído da linha de base dos cromatogramas (Lindsay, 1992), e variaram entre 0,01 e 0,24 ng/g (Tab. 2.1)

A quantificação dos PAHs foi validada pela análise de material de referência SRM 2977 (NIST – Tecido liofilizado de mexilhões *Perna perna*). Cerca de 2 gramas ($n=3$) de SRM 2977 foi extraído, purificado e analisado do mesmo modo que as amostras. Na Tabela 2.2 estão apresentados os valores certificados, as concentrações obtidas e as

taxas de recuperação dos diferentes PAHs do material de referência, que variou entre 55,1 (pireno) e 122,6 % (naftaleno).

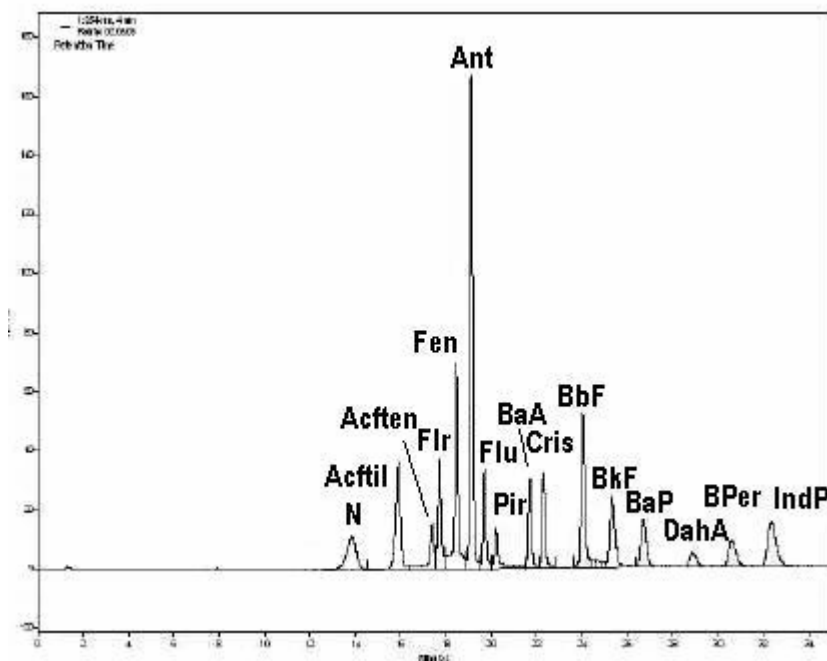


Figura 2.3 - Cromatograma do padrão de PAHs

Tabela 2.2 -Comparação da concentração de PAHs obtidos no material de referência SRM 2977 (NIST) com as certificadas, e respectivas taxas de recuperação ($n=3$).

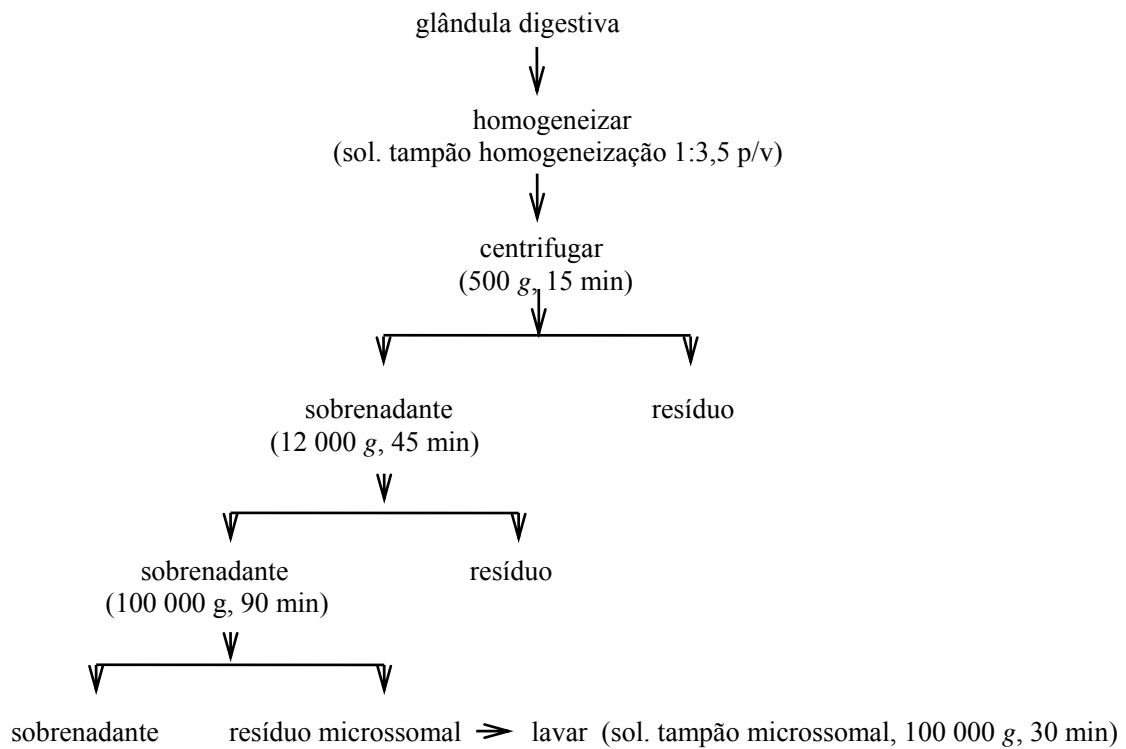
Compostos	SRM 2977 (ng/g p.seco)		Taxa de recuperação (%)
	Concentrações certificadas	Concentrações obtidas	
Naftaleno	19 ± 5**	23,3 ± 0,72	122,6
Acenafteno	4,2 ± 0,4**	4,45 ± 0,28	106,0
Fluoreno	10,24 ± 0,43	10,9 ± 3,11	106,9
Fenantreno	35,1 ± 3,8	31,7 ± 4,42	90,3
Antraceno	8 ± 4**	5,8 ± 0,28	72,5
Fluoranteno	38,7 ± 1,0	24,6 ± 2,62*	63,6
Pireno	78,9 ± 3,5	43,5 ± 19,6	55,1
Benzo(a)antraceno	20,34 ± 0,78	22,8 ± 3,3	112,1
Criseno	49 ± 2**	39,3 ± 6,34	80,2
Benzo(b)fluoranteno	11,01 ± 0,28	9,1 ± 1,32	82,7
Benzo(k)fluoranteno	4 ± 1**	3,98 ± 1,21	99,5
Benzo(a)pireno	8,35 ± 0,72	7,94 ± 1,7	95,1
Dibenzo(a,h)antraceno	1,41 ± 0,19	1,28 ± 0,2	90,8
Benzo(g,h,i)perileno	9,53 ± 0,43	8,73 ± 1,01	91,6
Indeno(1,2,3 cd)pireno	4,84 ± 0,81	4,20 ± 1,1	86,8

* Significativamente diferente; ** Valores de referência

2.3 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.3.1– Fracionamento subcelular

As fracções microsossomais das glândulas digestivas dos mexilhões obtiveram-se segundo o método de Livingstone e Farrar (1984) e Livingstone *et al.* (1985, 1989, 1995). Amostras compostas de 6 glândulas digestivas (2-3 gramas; $n=3$) foram pesadas para a determinação do peso húmido, e todos os procedimentos subsequentes realizados a 4°C. As amostras foram homogeneizadas, ainda congeladas, com tampão de homogeneização composto por 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 contendo 0,5 M de sacarose e 0,15 M de KCl, numa proporção de 1:3,5 (peso do tecido:volume de tampão). A homogeneização foi realizada com um homogeneizador Ultra Turrax T25 (Janke & Kunkel) durante 2 minutos, mantendo a amostra em banho de gelo. O homogeneizado foi seguidamente centrifugado a 500 g a 4 °C, durante 15 minutos e o sobrenadante centrifugado a 12000 g durante 45 minutos, também a 4 °C, numa centrifuga Beckman J2 MC. Este novo sobrenadante foi posteriormente centrifugado a 100000 g durante 90 minutos numa ultra-centrifuga Beckman XL 80. O precipitado resultante desta centrifugação foi cuidadosamente lavado com um pequeno volume de tampão microsossomal (20 mM Tris-HCl pH 7,6 e 20% glicerol (p/v)), a 100000 g durante 30 minutos. Este último precipitado é denominado fracção microsossomal, que contém pequenas vesículas da membrana do retículo endoplasmático, os ribossomas. Por fim a fracção microsossomal é ressuspendida em tampão microsossomal de modo a resultar numa concentração proteica de 5 a 10 mg/ml (o que equivale a 1 grama de tecido fresco em 0,5 ml de tampão), guardando-se em alíquotas a -80 °C não mais de duas semanas. Esquemáticamente, o procedimento foi o seguinte:



2.3.2– Sistema Monoxigenase de Função Mista (Sistema MFO)

O sistema MFO, também denominado sistema de monooxigenase dependente do citocromo P450, é um complexo multienzimático que funciona como uma cadeia de transporte de electrões, cujos componentes principais são o citocromo P450 (CYP450) e a NADPH citocromo *c* reductase (NADPH-red). Os componentes do sistema MFO foram analisados na fracção microsossomal da glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* por espectrofotometria UV-Vis

A - Citocromo P450 (CYP450)

As concentrações totais de citocromo P450 (CYP450) e o pico “418” (P418) foram quantificadas pela diferença de espectro de monóxido de carbono (CO) entre amostras

reduzidas com ditionite de sódio (Livingstone, 1988), usando um coeficiente de extinção de 91 mM⁻¹cm⁻¹ (Estabrook e Werringloer, 1978), num espectrofotómetro de feixe duplo UV-3000 Shimadzu. O protocolo laboratorial foi o seguinte:

- 1 ml de 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 900 µl de água milli-Q e 100 µl de microsomas foram misturados e divididos por duas cuvetes;
- o monóxido de carbono foi borbulhado numa cuvete (amostra) com um fluxo de 70 bolhas min⁻¹, durante 1 minuto. Seguidamente lê-se a linha de base com a cuvete da amostra e a de referência (sem CO), através de um varrimento de espectro entre os 400 e os 500 nm.
- adicionaram-se alguns grãos de ditionite de sódio às duas cuvetes e leu-se a diferença de densidade óptica entre os 400 e os 500 nm, em triplicado, utilizando a correcção da linha de base.

O pico a baixo comprimento de onda observado no mesmo espectro, com $\lambda_{\text{máx}}$ a cerca de 418 nm, mas variando entre 416 e 420 nm (Livingstone e Farrar, 1984), foi também quantificado em termos de unidades arbitrárias. (altura do pico $\lambda_{\text{máx}}$ - 490nm x 10³). Segundo Livingstone e Farrar (1984), este pico pode ser devido a uma molécula resultante da quebra do citocromo P450, mas devido à sua grande abundância é geralmente classificada como uma outra hemoproteína, tal como um citocromo ou uma peroxidase.

O cálculo da concentração do citocromo P450 obtém-se da seguinte forma:

$$\frac{\Delta A \times 10^6 \text{ pmol ml}^{-1}}{\varepsilon \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1})} \times \frac{1}{\frac{1}{2} V \text{ amostra (}\mu\text{l)}^*} \times \frac{10^3 \mu\text{l}}{[\text{prot}] \text{ (mg ml}^{-1})} = \text{pmol mg}^{-1} \text{ prot}$$

(*) $\frac{1}{2} V$ amostra – considera-se metade do volume da amostra pois esta é dividida por duas cuvetes. ΔA é a diferença de absorvância do pico obtido aos 450 nm.

Para a quantificação correspondente ao pico 418 é utilizada a seguinte equação:

$$\frac{\Delta A \times 10^3}{\frac{1}{2} V \text{ amostra } (\mu\text{l}) * } \times \frac{10^3 \mu\text{l}}{[\text{prot}] (\text{mg ml}^{-1})} = \text{unidades arbitrárias (u. a.)}$$

*) $\frac{1}{2} V$ amostra – considera-se metade do volume da amostra pois esta é dividida por duas cuvets. ΔA é diferença de absorvância do pico obtido aos 418 nm.

B - Citocromo b₅ (Cit b₅)

O citocromo b₅ foi quantificado de modo semelhante, medindo a diferença de absorvância entre os 409 e os 425 nm, com um coeficiente de extinção de 185 mM⁻¹cm⁻¹ (Estabrook & Werringloer, 1978), cujo protocolo laboratorial foi o seguinte:

- em duas cuvets colocaram-se 500 μl de 100 mM Tris-HCl pH 7,6; 400 μl de água milli-Q e 50 μl de microsomas. Seguidamente regista-se a linha de base;
- na cuvete da referência adiciona-se 50 μl de água milli-Q e na da amostra adiciona-se 50 μl de NADH (0,5 mg/ml de água milli-Q). Regista-se a diferença de densidade óptica entre os 400 e os 450 nm, em triplicado, utilizando a correcção da linha de base.

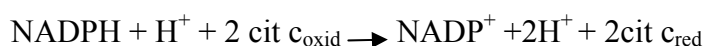
Os resultados da concentração do citocromo b₅ obtêm-se a partir do seguinte cálculo, onde é feita a correcção devida ao aumento da absorvância provocada pela adição do NADH:

$$\frac{(\Delta\text{OD} + 0,0007)}{\varepsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})} \times \frac{V \text{ cuvete } (\mu\text{l})}{V \text{ amostra } (\mu\text{l})} \times \frac{10^6}{[\text{prot}] (\text{mg ml}^{-1})} = \text{pmol b}_5 \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$$

onde ΔOD é a diferença de absorvância entre o pico obtido aos 409 e o pico obtido aos 425 nm.

C - NADPH citocromo c reductase (NADPH -red)

A actividade da enzima NADPH citocromo c P450 reductase (NADPH-red) foi determinada através do aumento de absorvância a 550 nm provocada pela redução do citocromo c. O citocromo reduzido tem um máximo de absorvância a 550 nm e um coeficiente de extinção $\epsilon=19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Shimakata *et al.*, 1972). O princípio segundo o qual se fez a medição baseia-se na seguinte reacção:



A quantificação foi efectuada utilizando 50 μl de microsomas num volume final de 1 ml de solução, que também continha 500 μl de Tris-HCl 100 mM pH 7,6; 50 μl de KCN 20 mM; 300 μl de água milli-Q; 50 μl de citocromo c 1,2 mM. As cuvetes são pré-incubadas durante 1 minuto à temperatura ambiente, adiciona-se os 50 μl de microsomas e lê-se a linha de base. Posteriormente adiciona-se 50 μl de NADPH 6 mM, dando-se início à reacção de redução do citocromo c, e lê-se o aumento da densidade óptica. A quantificação da enzima é corrigida com o factor de correcção 0,0002 equivalente ao aumento da densidade óptica provocado pelos 50 μl de NADPH num volume final de 1 ml, ao qual se chama taxa química. A actividade da NADPH-red obtém-se da seguinte forma:

$$\frac{\Delta A^* (\text{min}^{-1})}{\epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})} \times \frac{V \text{ cuvete } (\mu\text{l})}{V \text{ amostra } (\mu\text{l})} \times \frac{10^3}{[\text{prot}] (\text{mg ml}^{-1})} = \text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ prot}$$

* $\Delta A = (\Delta \text{abs-linha de base})$ - taxa química.

D - NADH citocromo b₅ reductase (NADH-red)

A quantificação desta enzima tem o mesmo princípio que a anterior, variando a quantidade de microsomas e de água, sendo 10 µl e 340 µl respectivamente. O factor de correcção utilizado para os cálculos da actividade da NADH cit b₅ reductase foi de 0,00018, equivalente ao aumento originado por 50 µl de NADH.

2.3.3 – Determinação da concentração de proteínas

Todos os resultados das análises bioquímicas são referentes ao conteúdo proteico dos organismos analisados. Assim, para a determinação das proteínas microsomais totais foi utilizada uma modificação do método de Lowry *et al.* (1951). Para efectuar a referida análise prepararam-se três soluções:

- Solução A – Solução aquosa de tartarato de sódio e potássio a 7 mM, carbonato de sódio a 35 mM e NaOH a 0,5 M.
- Solução B - Solução aquosa de tartarato de sódio e potássio a 7 mM, sulfato de cobre a 40 mM e NaOH a 0,1 M.
- Solução C – Reagente de Folin e Ciocalteu's diluído em água milli-Q na proporção 1:15.

Para a quantificação da concentração de proteínas foi efectuada uma recta de calibração, utilizando BSA (serum de albumina de bovino, Sigma) como padrão, a diferentes concentrações (0,02; 0,04; 0,1; 0,2 e 0,4 mg/ml).

De seguida pipetam-se para tubos de ensaio, em triplicado, 250 µl dos padrões e 250 µl de água Milli-Q (branco de água), 250 µl de amostra diluída 1:50 ou 1:100 e 250 µl do tampão microssomal (branco da amostra), diluída da mesma forma que a amostra. Adiciona-se a cada tubo 230 µl de solução A, colocam-se os tubos em banho-maria a 50°C durante 10 minutos. Seguidamente, adiciona-se a cada tubo 50 µl de solução B e deixa-se repousar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Adiciona-se depois 750 µl de solução C a cada um dos tubos, que se colocam posteriormente a 50 °C durante 10 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a concentração das proteínas foi determinada por espectrofotometria de absorção a um comprimento de onda de 650 nm.

2.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados (hidrocarbonetos e sistema MFO) são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças verificadas nos tecidos dos mexilhões entre locais e meses foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) às quais foi efectuado o teste de Duncan, para um nível de significância de 0,05, através do programa Statistica 5.0. De modo a determinar os padrões gerais da distribuição espacial e sazonal dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, assim como dos componentes do sistema MFO, foi efectuada a análise dos componentes principais (PCA) e a análise de correspondência canónica (CCA), utilizando o programa Canoco (Ter Braak, 1995). Para avaliar as fontes e origens dos PAHs nos tecidos dos mexilhões, o perfil de distribuição dos PAHs individuais foi comparado com “assinaturas” retiradas da bibliografia, através do programa Umetrics, por intermédio da análise PLS (Partial Least Squares). A análise de regressão foi também utilizada nas relações entre o CYP450 e os PAHs.

**3 – DISTRIBUIÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS (HAs) EM
MEXILHÕES *Mytilus galloprovincialis* DA COSTA SUL DE PORTUGAL**

3.1 - INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos do petróleo incluem os hidrocarbonetos alifáticos (*n*-alcanos, alcanos ramificados, isoprenoides e compostos cíclicos tais como os marcadores geoquímicos hopanos e esteranos) e hidrocarbonetos aromáticos incluindo os PAHs. A sua análise pode ser usada de modo a fornecer informação sobre as fontes de contaminação por hidrocarbonetos e a extensão da degradação ambiental dos mesmos.

Os hidrocarbonetos alifáticos de origem antropogénica que entram no meio marinho incluem o petróleo e seus derivados, produtos de combustão e compostos sintéticos. A via de entrada no ambiente marinho pode ser diversa, desde acidentes com petroleiros, deposição atmosférica, escorrências urbanas, industriais e domésticas. Além das fontes antropogénicas, os hidrocarbonetos sintetizados por organismos (hidrocarbonetos biogénicos) podem também estar presentes no ambiente, cuja fracção alifática é a predominante e ocorrem em várias espécies de animais e plantas marinhos e terrestres (Peña-Méndez *et al.*, 2001).

Os *n*-alcanos são hidrocarbonetos saturados de cadeia linear (C_n+H_{2n+2}), cuja cadeia pode ter até 40 átomos de carbono ou mais. A sua concentração é maioritária nos hidrocarbonetos do petróleo e o predomínio de um determinado *n*-alcano pode identificar a sua origem. A presença (ou ausência) de uma lomba nos cromatogramas obtidos durante a análise química através da cromatografia gasosa (GC-FID), chamada mistura complexa não resolvida (Unresolved Complex Mixture – UCM), é um sinal da presença de contaminação petrolífera, e/ou da presença de uma mistura complexa de hidrocarbonetos biodegradados. A UCM é considerada o resultado de várias co-eluições de isómeros e homólogos de hidrocarbonetos ramificados e cíclicos, estruturalmente complexos (Mille *et al.*, 2007). Quanto menor for a UCM, maior será a degradação

ambiental sofrida. Os hidrocarbonetos isoprenoides, pristano e fitano, presentes nos crudes podem ser originados naturalmente (diagénicos) através de reacções pós-deposicionais envolvendo a hidrogenação catalítica dos fitadienos. Também podem ser biogénicos quando derivam da cadeia lateral de fitol da clorofila, quer sob condições de redução (fitano) quer sob condições de oxidação (pristano) (Mille *et al.*, 2007).

A identificação da contaminação por hidrocarbonetos alifáticos baseia-se na análise de marcadores químicos que exibem perfis característicos que reflectem a origem da contaminação: biogénica, pirogénica, e/ou petrogénica, assim como o grau de degradação ambiental do contaminante. Os principais marcadores químicos usados são os *n*-alcanos totais (TAlc) (soma da concentração individual dos *n*-alcanos C14 ao C36), UCM; *n*-C17/Pristano; *n*-C18/Fitano; *n*-C17/*n*-C29; CPI - Índice de Preferência de Carbono (soma das concentrações individuais dos *n*-alcanos ímpares C15-C35 / soma das concentrações individuais dos *n*-alcanos pares C14-C36) e hidrocarbonetos isoprenoides (Pristano/Fitano) (Carro *et al.*, 2006).

Este Capítulo tem como objectivo estudar a distribuição espacial e sazonal da contaminação por hidrocarbonetos alifáticos em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais ao longo da costa Sul de Portugal, assim como identificar as fontes dessa contaminação através de marcadores químicos.

3.2 – MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de mexilhão *M. galloprovincialis* foram recolhidas nos 8 locais da costa Sul de Portugal: Sagres (SG), Lagos (LG), Portimão (PT), Vilamoura (VM), Faro (FR), Olhão (OL), Tavira (TV) e Vila Real de Santo António (VRSA) (Fig. 2.1; Cap. 2),

durante um ano consecutivo (distribuição anual): Inverno I (Fevereiro de 1996); Primavera (Abril de 1996), Verão (Agosto de 1996), Outono (Outubro de 1996) e Inverno II (Fevereiro de 1997) e pontualmente 6 anos depois (distribuição temporal): Inverno III (Dezembro 2003), para avaliar a evolução da contaminação ambiental por hidrocarbonetos alifáticos. A recolha das amostras, a extracção, fraccionamento e análise química dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs), assim como a análise estatística aplicada aos dados, estão descritos no Capítulo 2.

Os hidrocarbonetos alifáticos foram extraídos por Soxhlet com uma mistura de *n*-hexano/diclorometano, fraccionados por cromatografia de adsorção com sílica-alúmina, e quantificadas por GC-FID. O padrão de HAs é composto pelos *n*-alcanos C15, C16, C17, C18, C19, C22, C23, C24, C28, C32, C36 e pristano, diluído em *iso*-octano em concentrações que oscilam entre 6,66 e 13,33 µg/ml. Os limites de detecção oscilam entre 0,1 e 0,3 ng/g. Não foram detectados HAs nos brancos analíticos. As diferenças da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos nos tecidos dos mexilhões entre locais e meses foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) às quais foi efectuado o teste de Duncan, para um nível de significância de 0,05, através do programa Statistica 5.0. De modo a determinar os padrões gerais da distribuição espacial e sazonal dos HAs, foi efectuada a análise dos componentes principais (PCA) e a análise de correspondência canónica (CCA), utilizando o programa Canoco (Ter Braak, 1995), como descrito no Capítulo 2.

3.3 - RESULTADOS

3.3.1- Distribuição Anual

A - *n*-alcanos totais e UCM

A concentração total de *n*-alcanos (TAlc: somatório da concentração individual dos *n*-alcanos C14 ao C36) nos tecidos de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da costa Sul de Portugal está representada na Figura. 3.1 e na Tabela 3.1. De um modo geral, os níveis de TAlc são mais elevados no Outono e no Inverno do que na Primavera e no Verão. Os níveis mais elevados foram detectados em VM (essencialmente no Verão, Outono e Inverno I e II), e em OL (no Outono e Inverno I), embora LG e VRSA também apresentem níveis máximos na Primavera e Inverno II, respectivamente. Os valores mínimos ocorrem predominantemente em FR e TV.

No Inverno I a concentração de TAlc é superior em OL ($21,8 \pm 1,8 \mu\text{g/g ph}$), seguida de VM ($19,3 \pm 2,3 \mu\text{g/g ph}$) e VRSA ($11,3 \pm 0,9 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$), enquanto que nos restantes locais o teor de TAlc é semelhante sendo mínimo em TV ($1,8 \pm 0,4 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$). Na Primavera registam-se os teores mínimos de TAlc ao longo do ano, com valores que variam entre $1,5 \pm 0,1$ (TV) e $6,8 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$ (LG), e decrescem para VM ($5,4 \pm 0,2 \mu\text{g/g ph}$) e PT ($4,5 \pm 0,3 \mu\text{g/g ph}$) sendo estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Sagres (SG) e FR apresentam teores de *n*-alcanos semelhantes e superiores aos registados em OL, TV e VRSA ($p < 0,05$). Quanto aos TAlc existentes no Verão, verifica-se que os níveis são significativamente superiores em VM ($11,5 \pm 1,8 \mu\text{g/g ph}$), seguida de SG ($5,8 \pm 0,9 \mu\text{g/g ph}$) e PT ($3,7 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$) sendo semelhantes nos restantes locais ($p < 0,05$).

Tabela 3.1 - Concentração de TAlc e UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) e razão UCM/TAlc, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da Costa Sul de Portugal, durante um ano.

Mês	Local	TAlc	UCM	UCM/TAlc
INVERNO I	SG	5,7 \pm 0,9	160 \pm 29	28
	LG	2,6 \pm 0,6	132 \pm 33	51
	PT	4,2 \pm 0,5	167 \pm 34	40
	VM	19,3 \pm 2,3	531 \pm 82	28
	FR	5,5 \pm 0,6	147 \pm 15	27
	OL	21,8 \pm 1,8	231 \pm 40	11
	TV	1,7 \pm 0,4	25 \pm 1	15
	VRSA	11,3 \pm 0,9	145 \pm 26	13
PRIMAVERA	SG	3,5 \pm 0,3	65 \pm 14	19
	LG	6,8 \pm 0,5	139 \pm 29	20
	PT	4,5 \pm 0,3	72 \pm 12	16
	VM	5,4 \pm 0,2	93 \pm 19	17
	FR	3,5 \pm 0,5	52 \pm 12	15
	OL	2,7 \pm 0,5	60 \pm 10	22
	TV	1,5 \pm 0,1	48 \pm 6	32
	VRSA	2,6 \pm 0,4	91 \pm 9	35
VERÃO	SG	5,8 \pm 0,9	129 \pm 25	22
	LG	1,6 \pm 0,2	45 \pm 5	29
	PT	3,7 \pm 0,5	53 \pm 12	14
	VM	11,4 \pm 1,8	216 \pm 41	19
	FR	1,9 \pm 0,5	18 \pm 3	9
	OL	2,1 \pm 0,5	24 \pm 4	12
	TV	3,0 \pm 0,5	39 \pm 8	13
	VRSA	2,2 \pm 0,2	39 \pm 7	18
OUTONO	SG	4,7 \pm 0,6	95 \pm 7	20
	LG	2,9 \pm 0,3	43 \pm 11	15
	PT	10,6 \pm 1,6	207 \pm 42	20
	VM	16,7 \pm 2,5	429 \pm 106	26
	FR	2,9 \pm 0,2	48 \pm 12	17
	OL	14,0 \pm 1,6	306 \pm 51	22
	TV	2,7 \pm 0,2	59 \pm 10	22
	VRSA	5,0 \pm 0,4	24 \pm 4	5
INVERNO II	SG	3,2 \pm 0,4	51 \pm 15	16
	LG	2,6 \pm 0,2	52 \pm 7	20
	PT	1,1 \pm 0,1	27 \pm 3	25
	VM	16,4 \pm 4,6	381 \pm 14	23
	FR	3,6 \pm 0,5	31 \pm 6	9
	OL	5,4 \pm 1,0	36 \pm 9	7
	TV	1,5 \pm 0,2	21 \pm 2	14
	VRSA	34,3 \pm 2,6	776 \pm 52	23

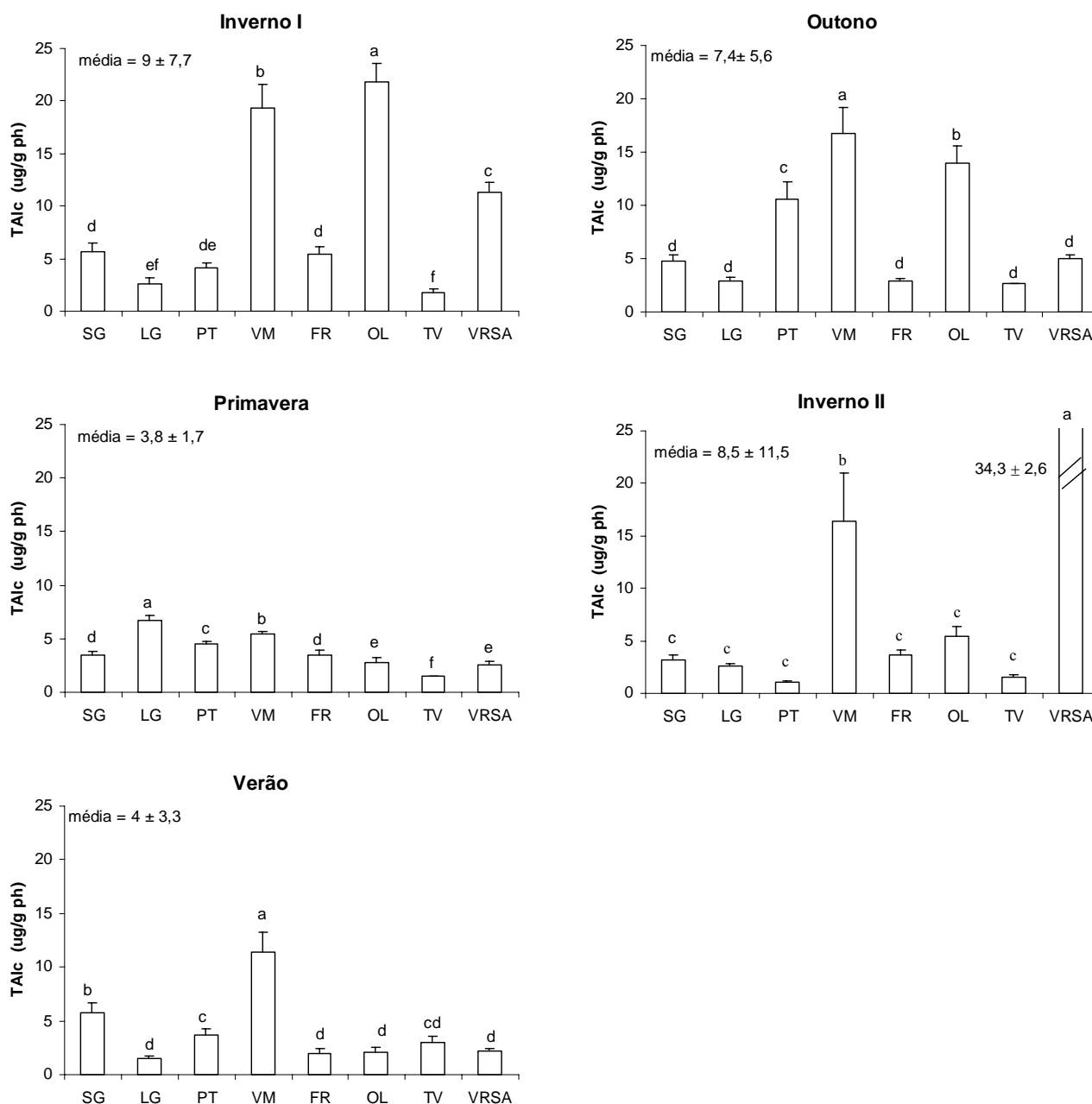


Figura 3.1 – Variação espacial da concentração total de *n*-alcanos (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano, na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test $p < 0,05$).

A concentração de TAlc no Outono é superior à ocorrida no Verão e varia entre $2,7 \pm 0,02 \mu\text{g/g ph}$ em (TV) e $16,7 \pm 2,5 \mu\text{g/g ph}$ (VM). Os níveis decrescem de VM para OL ($14,0 \pm 1,6 \mu\text{g/g ph}$) e PT ($10,6 \pm 1,6 \mu\text{g/g ph}$) enquanto que nos restantes locais da

costa Sul de Portugal, os teores são semelhantes ($p < 0,05$). Por outro lado, no Inverno II, VRSA apresenta a concentração máxima ($34,3 \pm 2,6 \mu\text{g/g ph}$) que é cerca de 32 vezes superior à detectada em PT ($1,1 \pm 0,1 \mu\text{g/g ph}$) e cerca de 3 a 4 vezes superior às concentrações médias dos restantes meses estudados.

A variação sazonal da concentração de TAlc (Fig. 3.2) nos diferentes locais confirmam que o Inverno I e II e o Outono apresentam níveis superiores na maioria dos locais estudados, com excepção de LG que apresenta níveis superiores na Primavera ($6,8 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$) e em TV no Verão ($3,0 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$).

UCM

Em geral, a presença de uma UCM nos cromatogramas dos hidrocarbonetos alifáticos pode ser usado como um critério de diagnóstico para a presença de petróleo (Readman *et al.*, 2002), reflectindo uma contaminação crónica por este tipo de compostos (Tolosa *et al.*, 2003). A UCM é considerada uma mistura complexa de muitos isómeros e homólogos de hidrocarbonetos lineares e ramificados que não podem ser resolvidos pelas colunas capilares de GC, e aparece como uma “lomba” nos cromatogramas (Bouloubassi e Saliot, 1993). A Figura 3.3 mostra alguns dos cromatogramas típicos, onde se identifica a UCM. Na Figura 3.4 e Tabela 3.1 apresenta-se a concentração média (\pm desvio padrão) de UCM ($\mu\text{g/g ph}$) nos tecidos moles dos mexilhões recolhidos em diferentes locais ao longo da costa Sul de Portugal, durante um ano. A variação da concentração de UCM é semelhante ao padrão da concentração total de *n*-alcanos, ou seja, os meses onde os teores de UCM são mais elevados são o Inverno I e Outono (VM e OL) e Inverno II (VM e VRSA), enquanto que as menores concentrações se registam na Primavera e no Verão.

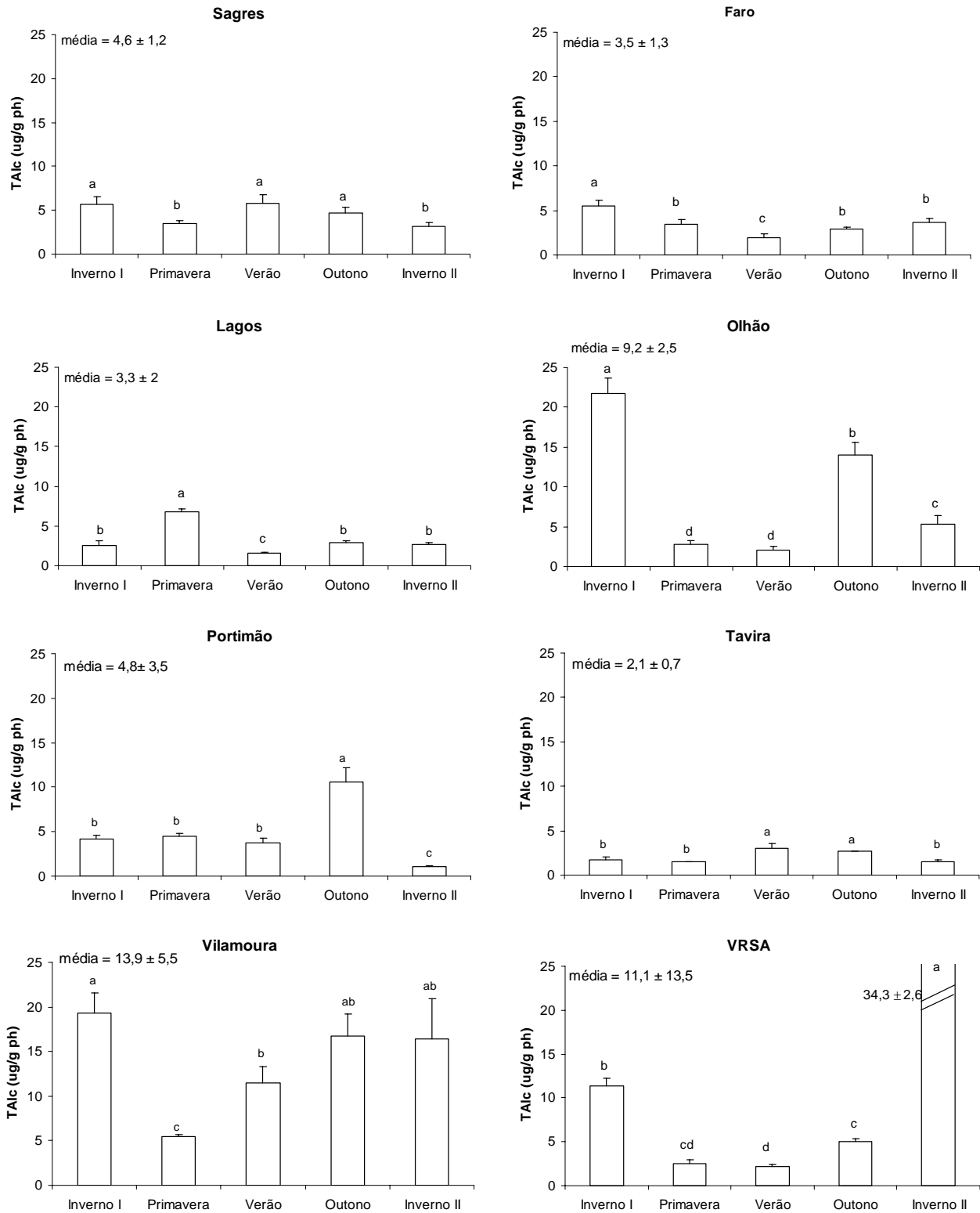


Figura 3.2 - Variação sazonal da concentração total de *n*-alcanos (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test $p < 0,05$).

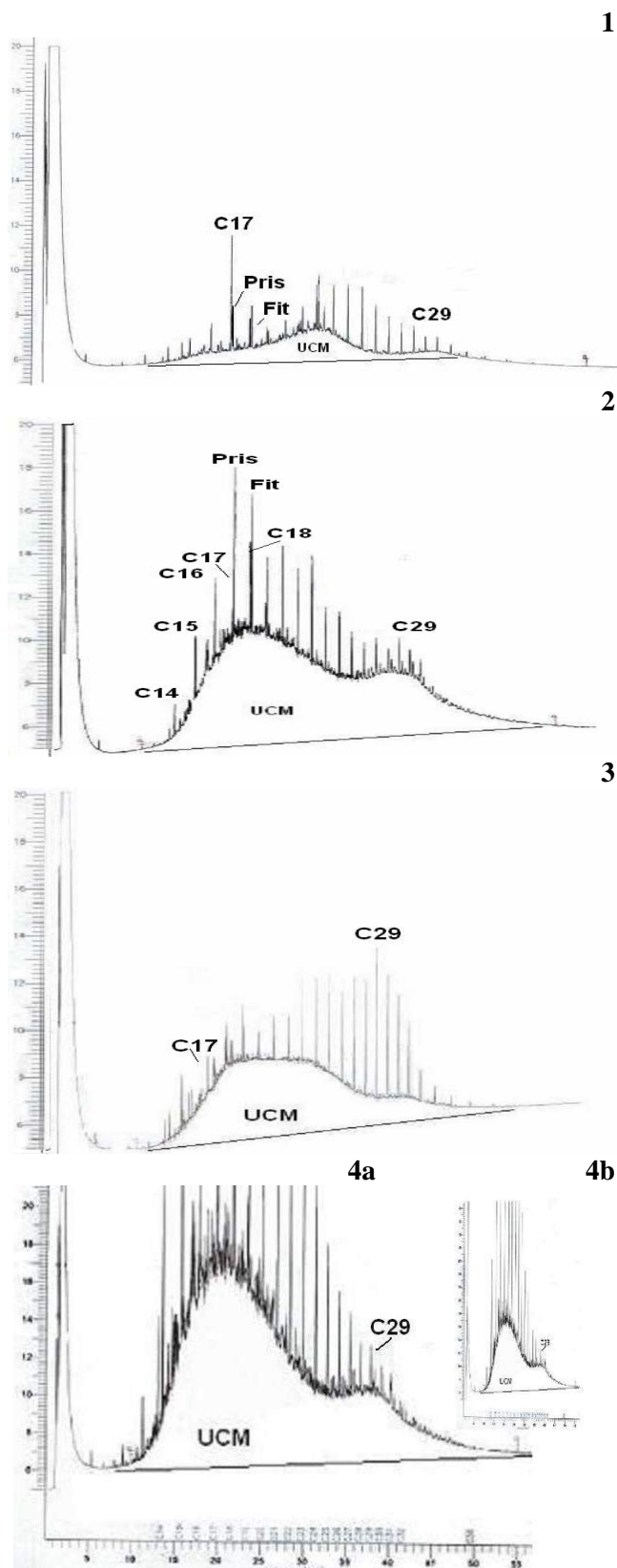


Figura 3.3 – Perfis cromatográficos da fracção dos hidrocarbonetos saturados, obtido com coluna capilar. Os números indicam os n -alcanos; UCM: “unresolved complex mixture”. Os dados estão representados na mesma escala vertical e horizontal (com pormenor no dobro da escala vertical). 1: Faro Primavera; 2: Sagres Verão; 3: Olhão Inverno I; 4a e 4b: Vilamoura Inverno I)

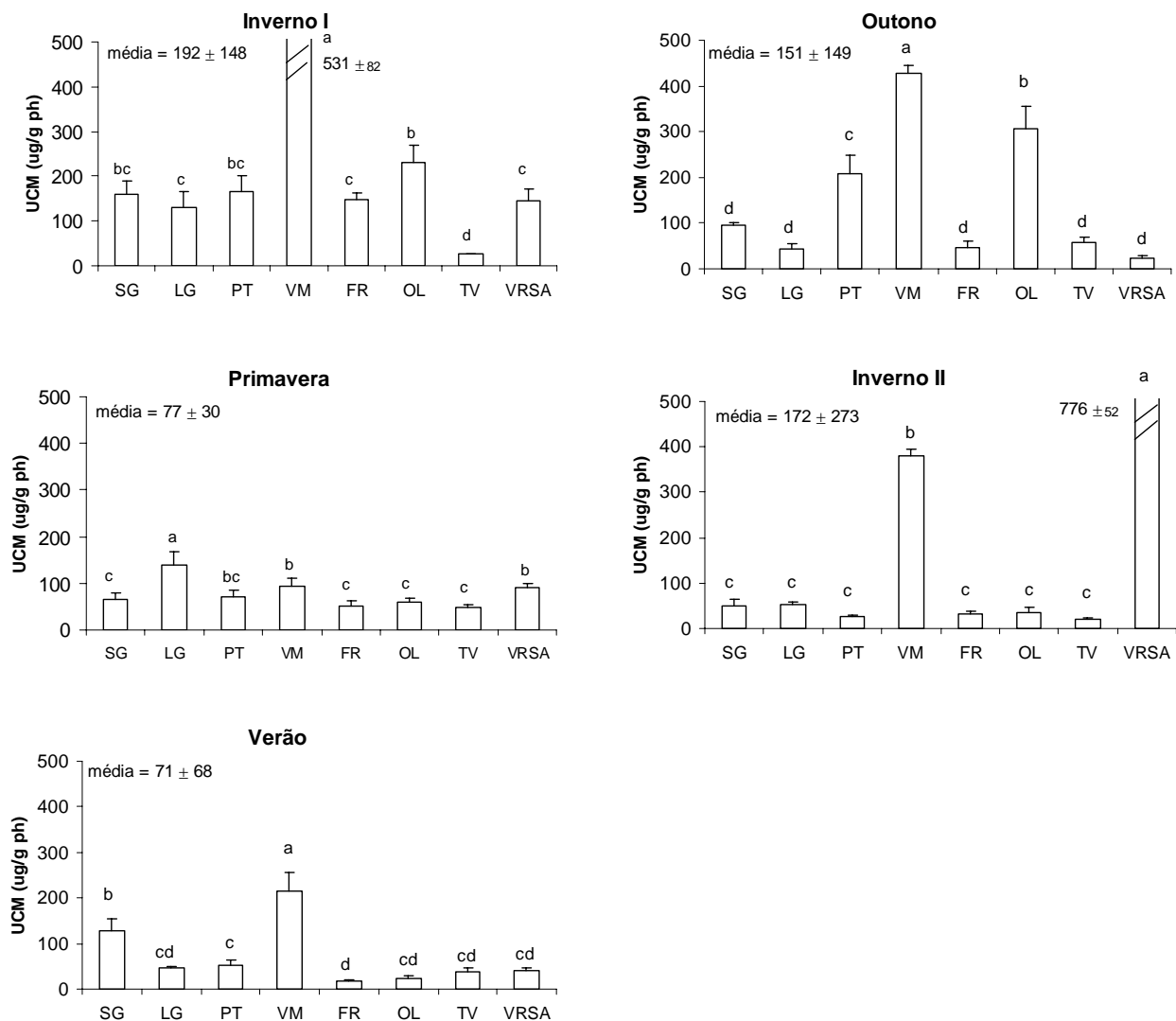


Figura 3.4 - Variação espacial de UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test $p < 0,05$).

No Inverno I a concentração de UCM foi significativamente superior em VM ($531 \pm 82 \mu\text{g/g ph}$) do que em OL ($231 \pm 40 \mu\text{g/g ph}$), cujos teores são semelhantes aos de SG ($160 \pm 29 \mu\text{g/g ph}$) e PT ($167 \pm 34 \mu\text{g/g ph}$). A menor concentração de UCM no Inverno I foi em FR ($25 \pm 1 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$). Na Primavera e no Verão as concentrações médias de UCM ao longo da costa Sul de Portugal foram as menores. Assim, na Primavera os níveis de UCM foram superiores em LG ($139 \pm 29 \mu\text{g/g ph}$), seguidos de VM ($93 \pm 19 \mu\text{g/g ph}$) e VRSA ($91 \pm 9 \mu\text{g/g ph}$) e mínimos em TV ($48 \pm 6 \mu\text{g/g ph}$)

enquanto que no Verão a concentração de UCM variou entre $216 \pm 41 \mu\text{g/g ph}$ (VM) e $18 \pm 3 \mu\text{g/g ph}$ (FR) ($p < 0,05$), local que apresenta a menor concentração de UCM durante o período em estudo. No Outono os teores de UCM foram significativamente superiores em VM ($429 \pm 126 \mu\text{g/g ph}$) do que em OL ($306 \pm 51 \mu\text{g/g ph}$) e PT ($207 \pm 42 \mu\text{g/g ph}$), sendo semelhantes nos restantes locais ($p < 0,05$), atingindo o mínimo em VRSA ($24 \pm 4 \mu\text{g/g ph}$). Quanto ao Inverno II, embora as concentrações de UCM sejam semelhantes ao longo da costa e da mesma ordem de grandeza das dos meses anteriores ($p < 0,05$), VM e VRSA apresentam valores máximos de, respectivamente, 381 ± 14 e $776 \pm 52 \mu\text{g/g ph}$. É ainda de referir que a concentração de UCM registada em VRSA neste mês foi a mais elevada do ano e de todos os locais ($p < 0,05$).

A variação sazonal da concentração de UCM (Fig. 3.5) nos diferentes locais é semelhante à de TAlc (Fig. 3.2), ou seja, o local com teores mais elevados de UCM é VM (excepto na Primavera), enquanto que TV apresenta as menores concentrações de UCM ao longo do ano.

Em SG os teores mais elevados ocorreram no Inverno I e Verão (160 ± 29 e $129 \pm 25 \mu\text{g/g ph}$, respectivamente), enquanto que em LG as concentrações são mais elevadas e semelhantes foram no Inverno I e na Primavera seguinte (132 ± 33 e $139 \pm 29 \mu\text{g/g ph}$, respectivamente), não variando nos restantes meses do ano ($p < 0,05$). PT e OL apresentam um perfil semelhante ao longo do ano, com valores máximos no Inverno I e Outono (significativamente diferentes em OL, $p < 0,05$) e semelhantes nos restantes meses do ano. VM ao longo dos meses apresenta níveis de UCM máximos e semelhantes no Inverno I, Outono e Inverno II (531 ± 82 , 429 ± 106 e $381 \pm 14 \mu\text{g/g ph}$, respectivamente), e mínimo na Primavera ($93 \pm 19 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$). FR e TV são os locais onde a concentração de UCM é menor, comparativamente aos restantes locais

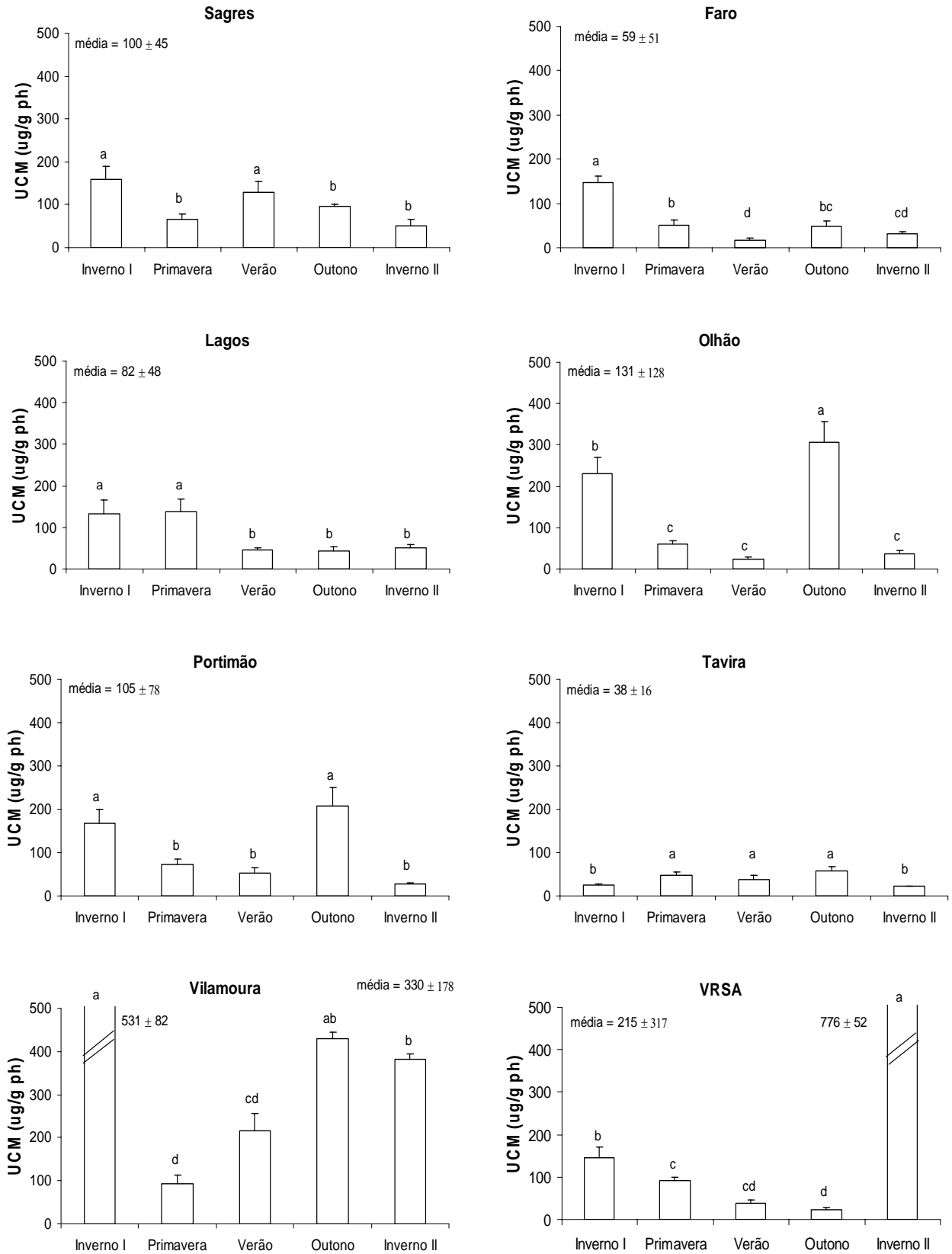


Figura 3.5 - Variação sazonal da UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

($p < 0,05$) mas apresentam um padrão distinto: em FR no Inverno I os teores de UCM são superiores aos restantes meses ($147 \pm 15 \mu\text{g/g ph}$), enquanto que em TV os níveis mais baixos são nos Invernos I e II (25 ± 1 e $21 \pm 2 \mu\text{g/g ph}$, respectivamente) e semelhantes nos restantes meses. Em VRSA as concentrações de UCM decrescem ao longo do tempo, surgindo um máximo no Inverno II ($776 \pm 52 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$), correspondendo ao máximo registado em todo o ciclo anual, para todos os locais.

Razão UCM/TAlc

A proporção entre a concentração dos hidrocarbonetos não resolvidos (UCM) e a concentração dos *n*-alcanos resolvidos (TAlc) reflecte o grau de degradação ambiental, e indica se a origem dos hidrocarbonetos alifáticos é recente ou crónica. Valores elevados de UCM quando acompanhados de concentrações elevadas de *n*-alcanos são indicadores de contaminação recente, normalmente acompanhadas por níveis elevados de pristano e fitano, de origem petrogénica. Contrariamente, concentrações menores de UCM e TAlc, embora apresentem uma razão UCM/TAlc na mesma ordem de grandeza, reflectem contaminação crónica por hidrocarbonetos do petróleo.

Na Tabela 3.1 apresenta-se os resultados da razão UCM/TAlc em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal, durante um ano consecutivo. A proporção UCM/TAlc é da mesma ordem de grandeza em toda a costa, variando entre 14 e 35 na maioria das estações do ano e locais amostrados, indicando uma contaminação crónica destes hidrocarbonetos. É de salientar no entanto, a presença de valores mínimos desta razão (entre 5 e 9) no Verão, Outono e Inverno II que indicam contaminações recentes, e máximos em LG e PT no Inverno I (51 e 40, respectivamente), indicando uma grande degradação dos *n*-alcanos e por conseguinte

um tipo de contaminação mais antiga. Em VRSA no Inverno II a razão UCM/TAlc é 23, quando tanto a concentração de TAlc e UCM são extremamente elevadas relativamente aos outros locais e meses ($34,3 \pm 2,6$ e 776 ± 52 $\mu\text{g/g ph}$, respectivamente), indicando uma contaminação pontualmente aguda.

Para melhor avaliar as diferenças da concentração de TAlc, UCM e UCM/TAlc entre os diferentes locais e meses amostrados, foi aplicada a análise dos componentes principais (PCA) ao conjunto total de dados. Na Figura 3.6 representa-se os resultados da análise PCA, na qual os eixos 1 e 2 representam 67% da variância dos dados.

O gráfico dos *loadings* (Fig. 3.6 - cores) mostra algumas diferenças sazonais na medida em que associa na parte negativa do eixo 1 a maioria dos locais na Primavera, Verão e Inverno II enquanto que o lado positivo associa parte dos locais no Outono e todos do Inverno I. Quanto ao eixo 2, parece haver distinção entre locais, pois na parte positiva do eixo 2 agrupam-se locais predominantemente do sotavento, como VM, FR, OL, TV e VRSA, enquanto os locais de barlavento se agrupam na parte negativa do eixo 2, havendo mistura dos diversos locais em redor da parte negativa do eixo 1 (Fig. 3.6 - números). Os *loadings* do PCA também mostram semelhanças entre a maioria dos locais e estações do ano em que a concentração de TAlc e UCM é semelhante, destacando no entanto VM, OL e PT na parte positiva do eixo 1 à medida em que a concentração de TAlc e UCM aumenta, sendo VRSA no Inverno II o local com maiores concentrações destes hidrocarbonetos, e que por conseguinte se diferencia dos restantes locais. No entanto a razão UCM/TAlc (eixo 2) não é determinante em VRSA, mas sim em SG, PT, e LG no Inverno I onde a razão tem valores máximos. Em oposição ressalta OL no Inverno I (eixo 2) talvez devido à razão UCM/TAlc (11) que é inferior à dos restantes locais neste mês, embora não seja a razão mínima encontrada.

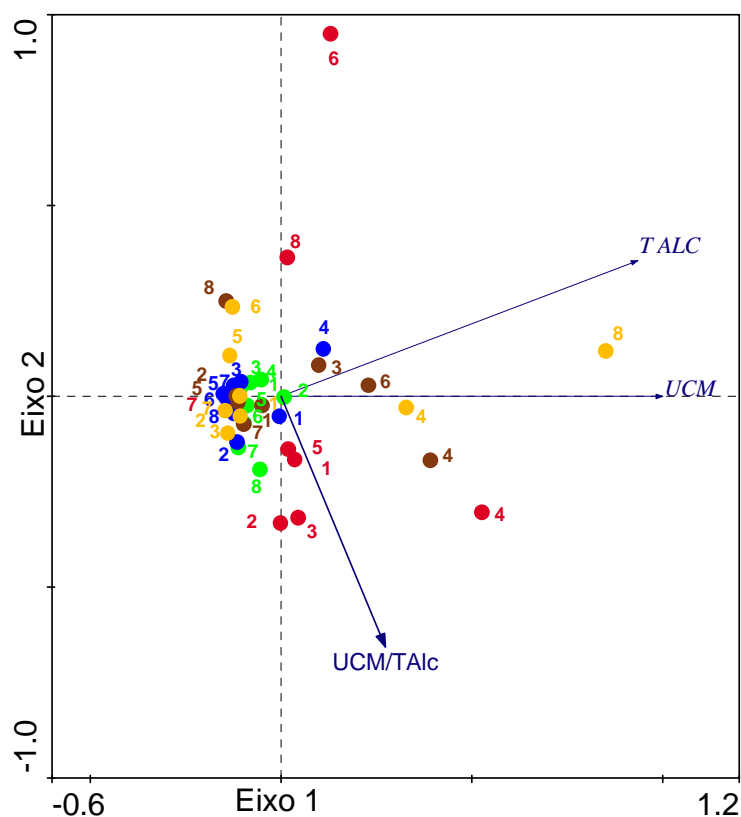


Figura 3.6 – Análise dos componentes principais (PCA) da concentração de TALc, UCM e razão UCM/TALc, nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante o estudo anual, indicando os *loadings* legendados por meses (cores) e por locais (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

Por outro lado, a concentração de TALc em OL no Inverno I ($21,8 \pm 1,8 \mu\text{g/g ph}$; Tab. 3.1; Fig. 3.1) é superior à dos restantes locais, mas a concentração de UCM em OL ($231 \pm 40 \mu\text{g/g ph}$; Tab. 3.1 Fig. 3,4) é inferior à de VM ($531 \pm 82 \mu\text{g/g ph}$), cuja razão UCM/TALc é de 27, fazendo com que o PCA separe OL e VM no Inverno I (eixo 2). LG e PT no Inverno I (parte negativa do eixo 2) estão muito relacionadas com a razão UCM/TALc (51 e 40, respectivamente) principalmente devido às relativamente baixas concentrações de TALc em relação à concentração de UCM, do que devido a elevadas

concentrações de ambos, como em VM, OL e VRSA. Por seu turno, VRSA no Inverno II separa-se dos restantes locais e meses principalmente devido às concentrações de TAlc e UCM anormalmente elevadas e não devido ao perfil da contaminação (razão UCM/TAlc) .

B - *n*-alcanos individuais e isoprenoides

As concentrações individuais dos *n*-alcanos (C14 ao C36)) e isoprenoides (pristano e fitano) analisados nos tecidos de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo de um ano em vários locais da costa Sul de Portugal, apresentam-se nas Tabelas 3.2 a 3.6.

Os resultados mostram uma presença generalizada de *n*-alcanos nos mexilhões da costa Sul de Portugal, ao longo do ano. O padrão de distribuição espacial dos *n*-alcanos individuais é dominado por uma moda nos *n*-alcanos de baixo peso molecular, do *n*-C14 ao *n*-C23, com máximos nos alcanos de C16, C17 e C18 e isoprenoides, durante a Primavera e Verão e em menor grau nos Invernos I e II e no Outono, nos quais o predomínio é de hidrocarbonetos de elevado peso molecular (C24-C36), com máximos no C27, C29 e C30.

Os *n*-alcanos C13, C15, C17 e C19 são considerados biogénicos (zooplankton e fitoplankton), enquanto que os *n*-alcanos C14, C16, C18 e C20 e os isoprenoides são considerados petrogénicos (Carro *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2005). Por outro lado, os *n*-alcanos de elevado peso molecular como o C27, C29 e C31 são característicos de plantas superiores terrestres (Lipiatou e Albaigés, 1994; Bouloubassi *et al.*, 1997).

Tabela 3.2 - Concentração individual dos hidrocarbonetos n-alcenos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal, no **Inverno I**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO I								
C14	109 ± 21	96 ± 16	125 ± 21	1465 ± 231	n.d.	256 ± 19	35*	n.d.
C15	241 ± 20	152 ± 26	213 ± 20	1480 ± 312	161 ± 13	276 ± 22	82*	118 ± 22
C16	394 ± 72	234 ± 54	561 ± 127	2528 ± 463	277 ± 21	628 ± 82	49 ± 8	465 ± 117
C17	262 ± 61	174 ± 31	371 ± 68	1307 ± 150	252 ± 29	338 ± 34	50 ± 8	330 ± 41
Pris	643 ± 119	434 ± 87	496 ± 98	2429 ± 196	158 ± 15	664 ± 103	55 ± 11	447 ± 74
C18	393 ± 93	328 ± 52	293 ± 65	1115 ± 130	285 ± 30	590 ± 104	146 ± 30	613 ± 101
Fit	479 ± 108	355 ± 76	362 ± 66	1586 ± 248	218 ± 19	472 ± 33	95 ± 14	774 ± 156
C19	306 ± 60	209 ± 46	170 ± 31	1211 ± 288	243 ± 23	282 ± 70	155 ± 32	315 ± 56
C20	413 ± 97	268 ± 56	273 ± 60	1169 ± 141	297 ± 19	438 ± 94	140 ± 15	677 ± 95
C21	543 ± 127	332 ± 49	365 ± 75	1570 ± 363	347 ± 35	656 ± 89	178 ± 18	660 ± 78
C22	642 ± 138	326 ± 83	437 ± 97	1828 ± 446	427 ± 33	1170 ± 170	238 ± 57	720 ± 153
C23	621 ± 132	184*	271 ± 36	1654 ± 360	358 ± 44	1386 ± 162	170 ± 26	557 ± 87
C24	434 ± 68	192*	214 ± 33	1545 ± 206	389 ± 70	1484 ± 176	141 ± 18	629 ± 25
C25	296 ± 63	153*	192 ± 21	724 ± 167	380 ± 83	1381 ± 198	78 ± 10	590 ± 75
C26	250 ± 64	130*	149 ± 16	398 ± 74	359 ± 63	1740 ± 302	68 ± 9	643 ± 154
C27	228 ± 32	138*	123 ± 28	340 ± 85	344 ± 45	2056 ± 412	78 ± 18	771 ± 39
C28	179 ± 39	157*	130 ± 17	312 ± 63	367 ± 92	2222 ± 542	65 ± 13	731 ± 5
C29	174 ± 26	145*	198 ± 26	318 ± 54	431 ± 107	2275 ± 478	61 ± 6	769 ± 97
C30	126 ± 23	187*	98 ± 13	209 ± 40	267 ± 53	1740 ± 327	67 ± 14	716 ± 131
C31	100 ± 13	185*	109 ± 11	186*	220 ± 34	1211 ± 172	53 ± 9	859 ± 173
C32	42*	n.d.	56*	146*	78 ± 11	983 ± 224	23*	511 ± 101
C33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	395 ± 78	22*	320 ± 26
C34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	272 ± 29	18*	201*
C35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	125*
C36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TAlc	5690 ± 853	2578 ± 576	4177 ± 456	19285 ± 2256	5482 ± 631	21779 ± 1838	1745 ± 351	11337 ± 884
Pris/Fit	1,34	1,22	1,37	1,53	0,72	1,40	0,58	0,58
C17/Pris	0,41	0,40	0,75	0,54	1,59	0,51	0,91	0,74
C18 /Fit	0,82	0,92	0,81	0,70	1,31	1,25	1,54	0,79
C17/C29	1,50	1,20	1,88	4,11	0,58	0,15	0,83	0,43
CPI	0,93	0,87	0,86	0,82	1,00	0,89	0,94	0,92
H. principal (%)	Pris (11)	Pris (17)	C16 (13)	C16 (13)	C29 (8)	C29 (10)	C22 (14)	C31 (8)

TAlc: $\sum nC_{14}-C_{36}$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC_{15}-C_{35})/(\sum nC_{14}-C_{36})$; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Tabela 3.3 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp)(ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal na **Primavera**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
PRIMAVERA								
C14	56±10	173± 17	157 ± 19	208 ± 24	75 ± 19	104 ± 9	45 ± 9	27*
C15	60±11	257 ± 45	183 ± 16	220 ± 40	96 ± 15	148 ± 24	81 ± 8	93*
C16	288 ± 46	479 ± 75	362 ± 49	509 ± 123	243 ± 28	249 ± 32	177 ± 25	169 ± 42
C17	359 ± 74	529 ± 102	387 ± 59	416 ± 96	699 ± 175	471 ± 78	164 ± 25	220 ± 32
Pristano	334 ± 63	816 ± 85	381 ± 53	527 ± 128	359 ± 71	351 ± 39	229 ± 34	237 ± 39
C18	629 ± 91	960 ± 147	582 ± 112	413 ± 101	318 ± 77	440 ± 75	264 ± 41	334 ± 37
Fitano	314 ± 50	781 ± 89	371 ± 45	399 ± 88	421 ± 71	289 ± 30	148 ± 18	194 ± 35
C19	356 ± 77	561 ± 62	393 ± 48	224 ± 11	290 ± 58	269 ± 51	160 ± 43	250 ± 41
C20	330 ± 44	493 ± 50	333 ± 48	318 ± 68	291 ± 62	230 ± 47	150 ± 40	209 ± 28
C21	354 ± 85	513 ± 59	271 ± 49	369 ± 86	160 ± 32	163 ± 21	144 ± 14	162 ± 36
C22	342 ± 68	569 ± 79	377 ± 71	391 ± 76	143 ± 26	167 ± 35	122 ± 7	170 ± 38
C23	261 ± 43	310 ± 62	332 ± 30	429 ± 94	73 ± 13	159 ± 26	69 ± 14	124 ± 26
C24	75 ± 15	141 ± 15	343 ± 36	338 ± 61	57 ± 13	117 ± 22	58 ± 4	89 ± 14
C25	48 ± 6	131 ± 25	116 ± 11	224 ± 24	77 ± 16	143*	38 ± 6	71 ± 10
C26	53 ± 9	195 ± 25	118 ± 15	211 ± 30	139 ± 39	n.d	35 ± 2	92 ± 21
C27	57 ± 9	303 ± 63	153 ± 16	176 ± 17	198 ± 37	148*	39*	128 ± 28
C28	77 ± 16	307 ± 31	194 ± 28	209 ± 39	163 ± 20	166*	34*	142 ± 22
C29	70 ± 9	364 ± 51	188 ± 19	220 ± 22	187 ± 46	148*	28*	124 ± 29
C30	49 ± 10	239 ± 27	177 ± 21	234 ± 24	148 ± 28	129*	17*	104 ± 8
C31	57 ± 8	174 ± 34	n.d	188 ± 43	120 ± 14	n.d	n.d	78 ± 6
C32	66 ± 11	126*	n.d	104 ± 13	69 ± 9	n.d	n.d	49*
C33	67 ± 11	n.d.	n.d	n.d	68 ± 11	n.d	n.d	19 *
C34	70*	n.d	n.d	n.d	81*	n.d	n.d	n.d
C35	37*	n.d	n.d	n.d	170*	n.d	n.d	n.d
C36	46*	n.d	n.d	n.d	40*	n.d	n.d	n.d
TAlc	3503 ± 347	6762 ± 454	4495 ± 308	5441 ± 199	3452 ± 519	2723 ± 531	1501 ± 55	2560 ± 370
Pris/Fit	1,06	1,04	1,03	1,32	0,85	1,22	1,55	1,22
C17/Pris	1,07	0,65	1,01	0,79	1,95	1,34	0,72	0,93
C18 /Fit	2,00	1,23	1,57	1,04	0,75	1,52	1,78	1,72
C17/C29	5,14	1,46	2,06	1,89	3,74	3,19	5,90	1,78
CPI	0,83	0,85	0,77	0,84	1,21	1,03	0,80	0,92
H. principal (%)	C18 (18)	C18 (14)	C18 (13)	Pris (10)	C17 (20)	C17 (17)	C18 (18)	C18 (13)

TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC15-C35)/(\sum nC14-C36)$; * : somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Tabela 3.4 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Verão**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
VERÃO								
C14	465 ± 106	57 ± 9	187 ± 11	417 ± 62	80 ± 1	n.d.	58 ± 11	61 ± 4
C15	593 ± 140	106 ± 19	258 ± 42	476 ± 87	57 ± 7	55 ± 7	89 ± 15	86 ± 10
C16	768 ± 164	174 ± 31	504 ± 99	893 ± 180	238 ± 40	117 ± 12	215 ± 46	155 ± 25
C17	376 ± 73	110 ± 7	289 ± 57	458 ± 49	118 ± 26	80 ± 13	247 ± 48	187 ± 28
Pristano	1294 ± 186	163 ± 35	564 ± 118	1572 ± 188	90 ± 9	133 ± 24	280 ± 43	231 ± 34
C18	617 ± 118	67 ± 13	437 ± 95	842 ± 216	224 ± 44	214 ± 40	452 ± 93	362 ± 50
Fitano	739 ± 140	156 ± 41	503 ± 117	886 ± 155	164 ± 28	142 ± 31	272 ± 44	238 ± 36
C19	479 ± 103	72 ± 17	336 ± 50	661 ± 141	154 ± 33	156 ± 30	362 ± 61	234 ± 19
C20	604 ± 106	86 ± 14	439 ± 34	735 ± 143	172 ± 31	143 ± 21	328 ± 58	205 ± 28
C21	626 ± 92	110 ± 15	329 ± 30	954 ± 170	174 ± 14	170 ± 20	300 ± 63	187 ± 19
C22	571 ± 68	117 ± 22	413 ± 91	1067 ± 248	221 ± 26	167 ± 37	345 ± 80	193 ± 26
C23	160 ± 34	118 ± 27	39 ± 8	900 ± 175	189 ± 32	198 ± 18	274 ± 49	154 ± 32
C24	57 ± 9	106 ± 24	35 ± 7	762 ± 151	180 ± 30	201 ± 24	262 ± 52	124 ± 25
C25	47 ± 10	89 ± 20	55 ± 12	604 ± 105	92 ± 10	181 ± 33	90 ± 8	70 ± 13
C26	46 ± 8	76 ± 12	67 ± 7	545 ± 80	63 ± 8	193 ± 30	n.d.	52 ± 10
C27	100 ± 19	87 ± 23	74 ± 16	503 ± 101	77 ± 16	208 ± 10	n.d.	58 ± 10
C28	47 ± 6	52 ± 11	107 ± 15	570 ± 84	83 ± 17	173 ± 19	n.d.	55 ± 5
C29	27 ± 6	46 ± 8	100 ± 23	477 ± 76	43 ± 5	150 ± 30	n.d.	48 ± 3
C30	84 ± 13	51 ± 11	84 ± 12	279 ± 26	50*	92*	n.d.	38*
C31	80 ± 10	29 ± 6	57 ± 13	160 ± 30	43*	31*	n.d.	19*
C32	74 ± 10	30 ± 4	43*	143 ± 32	49*	n.d.	n.d.	n.d.
C33	56*	23*	n.d.	n.d.	58*	n.d.	n.d.	n.d.
C34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36*	n.d.	n.d.	n.d.
C35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	39*	n.d.	n.d.	n.d.
C36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TAlc	5784 ± 944	1554 ± 176	3743 ± 489	11446 ± 1812	1915 ± 506	2062 ± 494	3023 ± 498	2198 ± 202
Pris/Fit	1,75	1,05	1,12	1,77	0,55	0,94	1,03	0,97
C17/Pris	0,29	0,67	0,51	0,29	1,30	0,61	0,89	0,81
C18/Fit	0,84	0,43	0,87	0,95	1,36	1,51	1,66	1,52
C17 C29	13,83	2,40	2,88	0,96	2,75	0,53	-	3,90
CPI	0,76	0,97	0,66	0,83	0,75	0,95	0,82	0,84
H. principal (%)	Pris (22)	C16 (11)	Pris (15)	Pris (14)	C16 (12)	C18 (10)	C18 (15)	C18 (16)

TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC15-C35)/(\sum nC14-C36)$; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Tabela 3.5 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Outono**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
OUTONO								
C14	57 ± 13	57 ± 3	390 ± 64	228 ± 18	62 ± 5	106 ± 12	116 ± 7	220 ± 26
C15	145 ± 39	124 ± 22	459 ± 97	346 ± 51	94 ± 14	169 ± 33	131 ± 3	222 ± 24
C16	137 ± 25	188 ± 41	507 ± 114	720 ± 172	241 ± 29	315 ± 70	300 ± 65	337 ± 58
C17	119 ± 17	233 ± 33	463 ± 97	490 ± 113	145 ± 29	372 ± 53	191 ± 42	280 ± 23
Pristano	414 ± 104	252 ± 1	1608 ± 166	825 ± 22	161 ± 18	381 ± 50	223 ± 16	509 ± 83
C18	144 ± 38	134 ± 10	506 ± 138	897 ± 144	153 ± 35	455 ± 94	175 ± 36	382 ± 51
Fitano	307 ± 61	278 ± 34	1252 ± 189	905 ± 222	245 ± 29	445 ± 76	274 ± 40	227 ± 34
C19	116 ± 12	95 ± 7	464 ± 70	556 ± 133	113 ± 17	346 ± 24	197 ± 29	301 ± 62
C20	144 ± 12	173 ± 39	563 ± 97	550 ± 155	184 ± 25	335 ± 56	226 ± 32	335 ± 42
C21	124 ± 18	159 ± 31	422 ± 74	553 ± 78	124 ± 27	316 ± 50	170 ± 4	333 ± 36
C22	153 ± 16	163 ± 21	513 ± 67	677 ± 153	172 ± 24	372 ± 47	202 ± 36	384 ± 58
C23	191 ± 21	143 ± 19	499 ± 56	696 ± 164	139 ± 30	405 ± 20	134 ± 14	290 ± 52
C24	266 ± 58	146 ± 34	573 ± 86	869 ± 231	139 ± 25	631 ± 85	117 ± 3	295 ± 49
C25	283 ± 29	184 ± 20	672 ± 116	1788 ± 219	141 ± 30	924 ± 176	96 ± 17	228 ± 2
C26	316 ± 59	158 ± 14	731 ± 164	1807 ± 406	159 ± 31	1233 ± 233	105*	233 ± 18
C27	349 ± 92	159 ± 42	867 ± 209	1968 ± 450	178 ± 23	1621 ± 368	164 ± 11	273 ± 48
C28	391 ± 77	180 ± 27	876 ± 202	1865 ± 185	185 ± 19	1545 ± 321	101*	272 ± 59
C29	502 ± 90	170 ± 19	994 ± 176	860 ± 133	178 ± 28	1574 ± 255	79 ± 7	244 ± 48
C30	426 ± 84	155 ± 10	449 ± 86	571 ± 152	134 ± 28	1635 ± 134	108*	173 ± 38
C31	320 ± 57	157 ± 4	460 ± 70	585 ± 136	129 ± 19	903 ± 62	68 ± 10	151 ± 10
C32	254 ± 40	75 ± 13	161 ± 21	321 ± 80	91 ± 11	338 ± 46	94 ± 9	52*
C33	147 ± 13	52 ± 11	n.d.	163 ± 12	58 ± 13	101 ± 8	68*	64 ± 9
C34	155*	n.d.	n.d.	308*	41 ± 6	131 ± 19	n.d.	n.d.
C35	163*	n.d.	n.d.	254*	26 ± 5	133 ± 24	n.d.	n.d.
C36	95*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	104 ± 7	n.d.	n.d.
TAlc	4720 ± 583	2905 ± 305	10570 ± 1606	16698 ± 2472	2877 ± 248	13987 ± 1562	2652 ± 212	5041 ± 359
Pris/Fit	1,35	0,91	1,28	0,91	0,65	0,86	0,81	2,25
C17/Pris	0,29	0,92	0,29	0,59	0,90	0,98	0,86	0,55
C18/Fit	0,47	0,48	0,40	0,99	0,62	1,02	0,64	1,68
C17 / C29	0,24	1,36	0,47	0,57	0,81	0,24	2,42	1,15
CPI	0,97	1,03	1,01	0,94	0,85	0,95	0,84	0,89
H. principal (%)	C29 (11)	Fit (10)	Pris (15)	C27 (12)	Fit (9)	C30 (12)	C16 (11)	Pris (10)

TAlc: $\sum nC_{14-C36}$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC_{15-C35})/(\sum nC_{14-C36})$; * : somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Tabela 3.6 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno II**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO II								
C14	55 ± 13	64 ± 13	72 ± 7	141 ± 29	39*	n.d.	n.d.	172 ± 7
C15	106 ± 24	59 ± 11	62 ± 14	212 ± 50	58*	n.d.	26 ± 8	353 ± 97
C16	94 ± 18	102 ± 23	73 ± 8	316 ± 71	101 ± 24	240 ± 13	103 ± 14	920 ± 97
C17	63 ± 17	93 ± 24	71 ± 6	479 ± 82	141 ± 26	242 ± 8	72 ± 4	1201 ± 111
Pristano	277 ± 46	117 ± 21	225 ± 39	712 ± 185	109 ± 10	304 ± 6	120 ± 21	914 ± 126
C18	153 ± 39	104 ± 10	75 ± 7	653 ± 119	160 ± 9	308 ± 24	131 ± 10	1725 ± 10
Fitano	167 ± 37	157 ± 17	182 ± 32	562 ± 140	122 ± 23	285 ± 13	100 ± 13	1085 ± 88
C19	94 ± 21	119 ± 19	74 ± 10	837 ± 112	80 ± 3	298 ± 26	119 ± 9	1271 ± 123
C20	135 ± 25	148 ± 17	66 ± 7	312 ± 50	153 ± 4	319 ± 16	131 ± 13	1181 ± 89
C21	193 ± 29	138 ± 19	106 ± 11	140 ± 25	124 ± 21	302 ± 23	137 ± 5	1023 ± 14
C22	208 ± 54	140 ± 24	117 ± 6	223 ± 27	141 ± 18	366 ± 30	143 ± 5	1246 ± 145
C23	198 ± 43	238 ± 31	68 ± 17	317 ± 50	146 ± 28	404 ± 54	118 ± 9	1642 ± 425
C24	202 ± 42	168 ± 40	28 ± 6	905 ± 147	331 ± 24	412 ± 56	110 ± 21	2559 ± 325
C25	196 ± 24	139 ± 28	20 ± 5	1242 ± 227	340 ± 36	334 ± 39	75 ± 9	3068 ± 378
C26	188 ± 26	138 ± 36	15 ± 3	1402 ± 403	305 ± 21	306 ± 26	79 ± 13	4090 ± 675
C27	251 ± 28	178 ± 16	40 ± 6	2223 ± 604	434 ± 73	273 ± 22	76 ± 19	2689 ± 205
C28	251 ± 40	150 ± 28	65 ± 11	1828 ± 341	421 ± 109	271 ± 19	95 ± 24	2723 ± 607
C29	230 ± 57	157 ± 39	47 ± 9	2878 ± 850	485 ± 85	311 ± 42	53 ± 11	4930 ± 1065
C30	186 ± 10	190 ± 39	48 ± 9	1644 ± 246	224 ± 27	291 ± 30	54 ± 11	1601 ± 310
C31	164 ± 27	162 ± 27	25 ± 1	1057 ± 198	117 ± 15	233 ± 19	50 ± 13	745 ± 194
C32	113 ± 11	45 ± 11	n.d.	620 ± 78	57 ± 8	314*	34*	445 ± 56
C33	68 ± 13	42 ± 10	n.d.	392 ± 57	57*	270*	n.d.	320 ± 62
C34	58 ± 4	43 ± 8	n.d.	245 ± 42	33*	311*	n.d.	376*
C35	55*	46*	n.d.	191 ± 41	n.d.	243*	n.d.	374*
C36	n.d.	n.d.	n.d.	68*	26*	239*	n.d.	108*
TAlc	3205 ± 423	2618 ± 243	1073 ± 57	16387 ± 4587	3636 ± 456	5371 ± 983	1539 ± 190	34333 ± 2563
Pris/Fit	1,66	0,74	1,24	1,27	0,89	1,07	1,19	0,84
C17/Pris	0,23	0,80	0,32	0,67	1,29	0,80	0,60	1,31
C18/Fit	0,92	0,66	0,41	1,16	1,31	1,08	1,31	1,59
C17/C29	0,27	0,59	1,51	0,17	0,29	0,78	1,36	0,24
CPI	0,99	1,06	0,92	1,19	1,00	0,86	0,82	1,03
H. principal (%)	Pris (9)	C23 (9)	Pris (21)	C29 (18)	C29 (13)	C24 (8)	C22 (9)	C29 (14)

TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC15-C35)/(\sum nC14-C36)$; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Assim, durante o ano, vários locais apresentaram origens de *n*-alcanos dos dois tipos ou seja LG, PT e VM no Inverno I (Tab. 3.2), apresentam uma distribuição de *n*-alcanos característicos de inputs petrogénicas enquanto que FR, OL e VRSA apresentam concentração máxima de C29 e C31, reflectindo a contribuição biogénica de plantas

superiores terrestres. Na Primavera (Tab. 3.3) FR e OL parecem ter um predomínio de *n*-alcanos biogénicos, enquanto que nos restantes locais são o C18 e o pristano que se apresentam como o *n*-alcano principal. No Verão (Tab. 3.4) os *n*-alcanos de origem petrogénica parecem dominar em todos os locais da costa, embora características de *inputs* algais, de zooplâncton e de plantas superiores terrestres também coexistam. No Outono (Tab. 3.5) a concentração de C27, C29 e C30 é máxima em SG, VM e OL, enquanto que nos restantes locais da costa predominam os isoprenoides, característicos de *inputs* petrogénicas. No Inverno II (Tab. 3.6) também coexistem *n*-alcanos de origem biogénica (VM, FR e VRSA) e petrogénica (SG e PT).

Razão C17/C29

Assumindo que a cinética de biodegradação é relativamente semelhante para o *n*-C17 e o *n*-C29, e uma vez que o *n*-C29 é característico de plantas superiores terrestres e o *n*-C17 é predominante em organismos marinhos, a razão entre estes dois alcanos reflecte a relativa partição dos hidrocarbonetos biogénicos alóctones e autóctones nos mexilhões (Mille *et al.*, 2006, 2007).

Ao longo do ano podemos verificar a presença destes dois *n*-alcanos em todos os locais e meses (excepto em TV no Verão onde não foi detectado C29), mas cujas concentrações variaram. Assim, no Inverno I (Tab. 3.2) a razão C17/C29 é superior a 1 em SG, LG, PT e VM (1,20 a 4,11) e inferior a 1 nos restantes locais (0,15 a 0,83) sendo a contribuição de *n*-alcanos de origem terrestre em OL superior à dos outros locais, onde o C29 foi o hidrocarboneto principal (2275 ± 478 ng/g ph em OL e 431 ± 107 ng/g ph em FR).

Quanto à Primavera (Tab. 3.3) a contribuição dos *n*-alcanos de origem marinha (fito e zooplacton, algas e bactérias) parece predominar em relação à contribuição das plantas superiores terrestres (razão C17/C29 >1) em todos os locais, particularmente em SG e TV onde se registaram os valores máximos (5,14 e 5,9 respectivamente).

No que diz respeito ao Verão (Tab. 3.4), SG foi o local que apresentou maior razão C17/C29 (13,83) (C17= 1294 ± 186 ng/n ph), em contraste com 0,53 em OL, onde o contributo de plantas superiores terrestres foi mais acentuado (C29= 150 ± 30 ng/g ph). Nos restantes locais a razão C17/C29 é relativamente semelhante (2,4 – 3,9) e em VM foi de 0,96 indicando que os contributos dos *n*-alcanos biogénicos autóctones e alóctones são idênticos.

No Outono (Tab. 3.5) e Inverno II (Tab. 3.6) as concentrações dos *n*-alcanos de origem terrestre (C27-C31) são superiores às concentrações *n*-alcanos de origem marinha, em 5-6 dos 8 locais da costa Sul de Portugal, como indica a razão C17/C29, que variou entre 0,24 e 0,81 no Outono e 0,17 e 0,78 no Inverno II. Contribuições biogénicas de origem marinha (C17/C29 >1) registam-se em TV no Outono (2,42) e no Inverno II (1,36), em LG e VRSA no Outono (1,36 e 1,15 respectivamente) e PT no Inverno II (1,51).

A contribuição de *n*-alcanos biogénicos (quer autóctones quer alóctones) para a concentração total de *n*-alcanos parece evidente em todos os locais e estações do ano, oscilando entre os dois tipos mas sendo a de origem marinha (C17) mais evidente na Primavera e Verão enquanto que no Outono e Invernos I e II a contribuição de alcanos biogénicos de origem em plantas superiores (C29) terrestres é dominante.

Espacialmente, verifica-se que a presença de *n*-alcanos biogénicos marinhos (C17) em SG e LG, PT deriva de *inputs* permanentes ao longo do ano (C17/C29 > 1), excepto no

Outono e Inverno II em que a presença de *n*-alcanos característicos de plantas superiores terrestres (C29) é mais acenuada. Em VM a razão C17/C29 é indicadora de *inputs* fito e zooplanctónicos (C17/C29>1) no Inverno I e Primavera, enquanto que nas restantes estações do ano a razão indica a existência de *inputs* alóctones de *n*-alcanos (C17/C29 <1). FR e TV ao longo do ano recebem contribuições biogénicas marinhas e terrestres enquanto que em OL os *n*-alcanos de origem alóctone parecem ser mais importantes (C17/C29 varia entre 0,15 e 0,78) que os marinhos (C17/C29 de 3,19 somente no Verão). VRSA apresenta fortes *inputs* marinhos ao longo do ano excepto no Inverno I e II em que os *n*-alcanos provenientes de plantas superiores terrestres se sobrepõem aos marinhos.

CPI

O índice de preferência de carbono ($\Sigma n\text{-C}_{\text{impar}}/\Sigma n\text{-C}_{\text{par}}$), que representa a abundância relativa entre os alcanos de cadeia linear ímpar vs alcanos de cadeia linear par, é menor ou igual a 1 para todos os crudes e hidrocarbonetos do petróleo (Farrington *et al.*, 1975, Simoneit, 1983, Solé *et al.*, 1996, Mille *et al.*, 2007). Um predomínio de *n*-alcanos pares (C14-C26) é caracteristicamente petrogénico (Carro *et al.*, 2006) enquanto que um CPI predominantemente ímpar é característico de fontes biogénicas. Estas podem ser devidas a *inputs* fito e zooplanctónicos se se verificar predomínio dos *n*-alcanos C13 ao C19 (ou máximo de C17) (Snedaker *et al.*, 1995) ou devido a *inputs* de hidrocarbonetos constituintes das ceras das plantas superiores terrestres, se o predomínio se verificar no intervalo entre o C27-C31 (ou máximo de C29) (Bernard *et al.*, 1995; Jeng, 2006; Mille *et al.*, 2006).

O CPI foi na maioria das vezes <1 ou muito próximo de 1, indicando contaminação generalizada por hidrocarbonetos do petróleo, mas em que a presença de *n*-alcanos biogénicos (C17, C29; $\text{CPI} > 1$) também se faz notar.

Os valores de CPI no Inverno I (Tab. 3.2) são muito próximos de 1 (0,82 a 1) indicando a presença de hidrocarbonetos petrogénicos em toda a costa, tal como os perfis cromatográficos indicam (grandes UCM e uma distribuição importante e regular de *n*-alcanos - Fig. 3.3). No entanto em LG a concentração dos *n*-alcanos pares de baixo peso molecular (C14-C22) é superior à dos de elevado peso molecular (C24-C30) enquanto que em OL os *n*-alcanos ímpares e pares de elevado peso molecular apresentam maiores concentrações que os de baixo peso molecular. Ambos os locais têm um CPI semelhante (0,87 e 0,89 respectivamente).

De uma maneira idêntica, na Primavera (Tab. 3.3) os valores de CPI variam entre 0,77 e 1,21 sendo a concentração dos *n*-alcanos ímpares e pares da mesma ordem de grandeza em quase todos os locais da costa Sul de Portugal (SG, LG, PT, VM, TV e VRSA) indicativos de *inputs* petrogénicos ($\text{CPI} < 1$), enquanto que em FR e OL os *n*-alcanos ímpares são predominantes ($\text{CPI} > 1$), indicando *inputs* biogénicos. Destes, os *n*-alcanos de baixo peso molecular (essencialmente o C17) são predominantes em relação aos *n*-alcanos ímpares de peso molecular superior.

No que diz respeito ao Verão (Tab. 3.4) os valores de CPI indicam que os hidrocarbonetos são maioritariamente de origem petrogenica ($\text{CPI} < 1$), embora fontes biogénicas possam coexistir, como indica a razão C17/C29.

À semelhança dos meses anteriores, os valores do CPI no Outono (0,84 – 1,03; Tab. 3.5) e Inverno II (0,82 – 1,19; Tab. 3.6) oscilam em redor do valor característico de hidrocarbonetos de origem petrolífera ($\text{CPI} = 1$), onde a proporção entre os *n*-alcanos

ímpares e pares é semelhante. No Inverno II o predomínio de *n*-alcanos ímpares de elevado peso molecular é mais evidente em VM e VRSA do que nos restantes locais.

Isoprenoides

Ao longo da costa Sul de Portugal tanto o pristano como o fitano (Tab. 3.2 a 3.6) detectados nos mexilhões foram os hidrocarbonetos principais em diversos locais e épocas do ano. Estes isoprenoides não se encontram presentes no biota que não tenha sido exposto a hidrocarbonetos de petróleo (o fitano raramente é biogénico, mas é um componente do petróleo), e são frequentemente considerados bons indicadores de contaminação por petróleo (Boehm *et al.*, 1996; Carro *et al.*, 2006). Por outro lado também houve situações em que as suas concentrações são semelhantes, sendo a sua razão menor ou semelhante a 1, indicando que os níveis destes isoprenoides têm origem petrogénica.

Assim, a razão Pris/Fit (pristano/fitano) no Inverno I (Tab. 3.2) variou entre 0,58 (TV e VRSA) e 1,53 (VM) indicando fontes petrogénicas devido a concentrações elevadas quer de pristano quer de fitano, sendo estas concentrações superiores em VM (2429 ± 196 e 1586 ± 248 ng/g ph, respectivamente). A origem petrogénica dos hidrocarbonetos em VM é também corroborada pelas razões C17/Pris (0,54) e C18/Fit (0,7) que por serem indicadoras da relativa taxa de degradação entre o *n*-alcano linear e o isoprenoide ramificado respectivo, indicam que as taxas de degradação favoreceram mais os *n*-alcanos lineares biogénicos do que os alcanos ramificados petrogénicos. Estas razões são usadas para avaliar a presença de óleos e a relativa biodegradação dos *n*-alcanos. Valores baixos destes índices (≤ 1) sugerem a presença de óleos degradados, enquanto que valores elevados (4 – 8) indicam origens fitoplanctónicas. Este perfil (Pris/Fit $\cong 1$;

C17/Pris e C18/Fit <1) é semelhante em toda a costa, no entanto em FR as razões C17/Pris e C18/Fit são >1 (1,59 e 1,31, respectivamente), indicadoras de persistência ou menor taxa de degradação dos *n*-alcanos de origem biológica (C17), que conjuntamente com a elevada concentração de C29, contribuem como fontes biogénicas recentes para a concentração total de *n*-alcanos.

Durante a Primavera (Tab. 3.3) a razão Pris/Fit nos diferentes locais da costa Sul de Portugal foi tal como para o Inverno I, muito próxima de 1 (0,85 em FR a 1.55 em TV), indicando fontes petrogénicas (também corroboradas pelo hidrocarboneto principal e pelo CPI). No entanto as razões C17/Pris e C18/Fit também são indicadores de *n*-alcanos biogénicos particularmente em SG, PT e OL (ambas >1), enquanto que em LG, VM, TV e VRSA a taxa de degradação do C18 (C18/Fit>1) é inferior à do C17 (C17/Pris <1), talvez por o C18 (o hidrocarboneto principal nestes locais) se encontrar em concentrações mais elevadas e por as concentrações de Fitano serem inferiores às de Pristano, excepto em FR, onde as razões Pris/Fit e C18/Fit <1, indicam a persistência de origem petrogénica.

No Verão (Tab. 3.4) as razões Pris/Fit, C17/Pris e C18/Fit (próximo ou inferior a 1) em SG, LG, PT e VM indicam presença das fontes petrogénicas de hidrocarbonetos ao longo da costa Sul de Portugal, por persistência dos isoprenoides relativamente aos *n*-alcanos lineares, embora em FR, OL, TV e VRSA a razão C18/Fit foi sempre >1 (entre 1,36 e 1,52) indicando uma taxa de degradação inferior para o C18 do que para o C17 (C17/Pris entre 0,61 e 0,89). Neste mês o predomínio do pristano como hidrocarboneto principal em alguns dos locais estudados também representa fontes petrogénicas. Relativamente ao Outono (Tab. 3.5) e Inverno II (Tab. 3.6), e tal como verificado nos meses anteriores a razão Pris/Fit nos mexilhões da costa Sul de Portugal (entre 0,65 e 2,25 no Outono e entre 0,74 e 1,66 no Inverno II) revela a presença de hidrocarbonetos

de origem petrogénica. As razões C17/Pris e C18/Fit <1 ao longo de toda a costa no Outono também indica a persistência de hidrocarbonetos isoprenoides petrogénicos em relação aos *n*-alcanos lineares, que apresentam taxas de degradação mais rápidas.

No Inverno II a razão C17/Pris é <1 na maioria dos locais, confirmando a presença de hidrocarbonetos petrogénicos, enquanto que a razão C18/Fit só apresenta razões inferiores a 1 em SG, LG e PT, sendo superior a 1 nos restantes locais, indicando uma presença recente de hidrocarbonetos *n*-alcanos lineares.

Espacialmente a razão Pris/Fit foi sempre <1 ou muito próximo de 1, em todos os locais e em todas as estações do ano (0,55 a 2,25), indicando contaminação generalizada por hidrocarbonetos de petróleo, tal como também indica os valores de CPI. Em SG e PT a razão Pris/fit foi sempre >1 enquanto que em LG no Outono e Inverno II e em VM no Outono a presença de fitano foi mais acentuada. Maiores concentrações de fitano em relação ao pristano foram encontradas em FR durante todo o ano (Pris/Fit oscilou entre 0,55 e 0,89) e em OL no Verão e no Outono (respectivamente 0,94 e 0,86). Em TV a concentração de pristano foi superior à concentração de fitano na Primavera, Verão e Inverno II (razão Pris/Fit oscilou entre 1,19 e 1,55 nestes meses) enquanto que no Inverno I e no Outono o fitano apresentou concentrações superiores. Já em VRSA a razão Pis/Fit oscila ao longo do ano, embora a concentração de fitano seja superior nos dois Invernos.

De modo a avaliar a distribuição espacial e temporal da concentração individual dos *n*-alcanos (Tab. 3.2 a 3.6), foi aplicada a análise canónica de correspondência (CCA) aos dados de *n*-alcanos acumulados nos tecidos dos mexilhões, transformados em proporção do total. A Fig. 3.7 representa as correlações entre as concentrações individuais dos *n*-

alcanos (compostos) e a sua projecção nos eixos principais (*factor loadings*) enquanto que a Fig. 3.8 representa as coordenadas das observações (locais) nos eixos principais (*factor scores*), otimizando a diferença entre as variâncias dos compostos e locais, respectivamente. A CCA permite sobrepor uma segunda matriz de dados (ambientais (temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido, etc) entre outras) que é usada no cálculo dos eixos principais, e que é representada por vectores. A magnitude do vector dá-nos a boa ou má representatividade da matriz secundária. Neste caso a matriz secundária representa as razões diagnóstico dos *n*-alcanos e o CPI. O eixo 1 e 2 representam 41,8 % da variância dos *n*-alcanos, e 89,5% da variância dos vectores (razões).

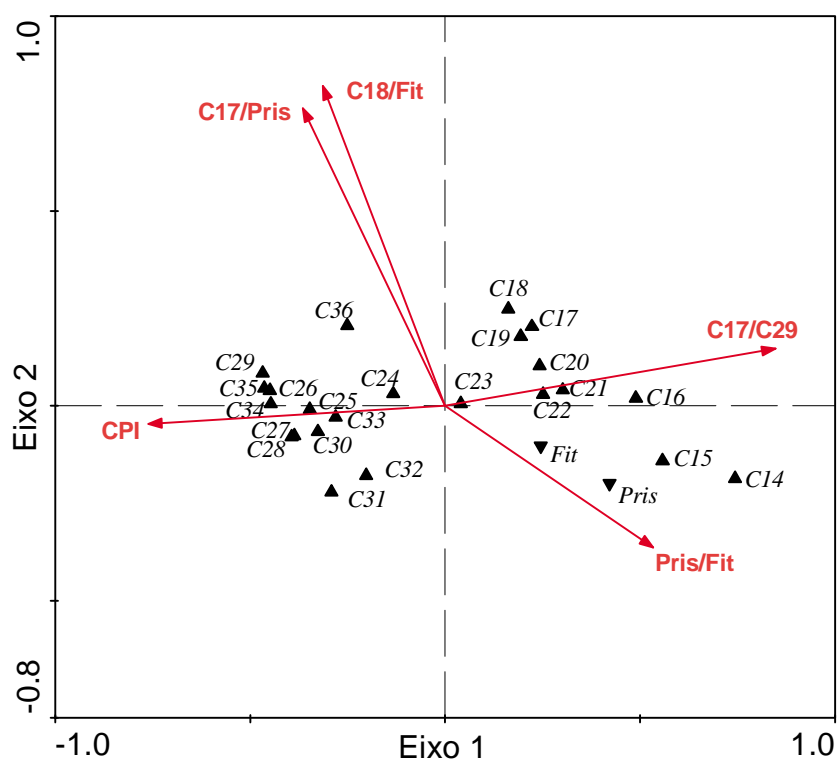


Figura 3.7 – Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos *n*-alcanos e dos isoprenoides nos mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, ao longo de um ano, indicando os *loadings* (compostos) no Eixo 1 e 2.

Como podemos verificar, na Fig. 3.7 o CCA discrimina os *n*-alcanos de baixo peso molecular (C14-C23) e os isoprenoides na parte positiva do eixo 1 e os de elevado peso molecular (C24-C36) na parte negativa, indicando diferentes comportamentos na distribuição dos *n*-alcanos. Assim, os *n*-alcanos de baixo peso molecular estão mais correlacionados com a razão C17/C29 e com a razão Pris/Fit do que com o CPI (parte negativa do eixo 1), pois tal como referido anteriormente, um predomínio de *n*-alcanos de baixo peso molecular (C15, C17 e C19) é característico de contribuições biogénicas marinhas enquanto que a razão Pris/Fit, indicadora de hidrocarbonetos petrogénicos está mais associada com o pristano do que com o fitano, uma vez que o pristano aparece mais vezes como hidrocarboneto principal (concentrações máximas) do que o fitano. Contrariamente, os *n*-alcanos de elevado peso molecular estão correlacionados com valores mais elevados de CPI e menores de C17/C29, reflectindo uma contribuição crónica tanto por hidrocarbonetos de petróleo (CPI), como de *n*-alcanos característicos de plantas superiores terrestres (C27, C29 e C31), que ocorrem várias vezes ao longo do ano e na costa como hidrocarbonetos principais. As razões C17/Pris e C18/Fit estão principalmente correlacionadas positivamente com o eixo 2, e inversamente relacionadas com a razão Pris/Fit (parte negativa do eixo 2 e positiva do eixo 1), indicando que as taxas de degradação dos *n*-alcanos lineares (C17 e C18) são semelhantes, e que quando as razões são superiores a 1 indicam *inputs* recentes de hidrocarbonetos em oposição a valores inferiores a 1, que indicam contribuições mais antigas e onde se verifica a persistência de isoprenoides.

Quando se representa graficamente os *scores* dos locais em todos os meses estudados (Fig. 3.8 - cores), podemos verificar que o CCA discrimina na parte negativa dos eixos 1 e 2 principalmente os meses de Inverno I e II e Outono, meses em que o CPI é mais

elevado e a razão C17/C29 baixa e na parte positiva os meses de Primavera e Verão, devido às razões C17/Pris e C18/Fit, com alguma sobreposição.

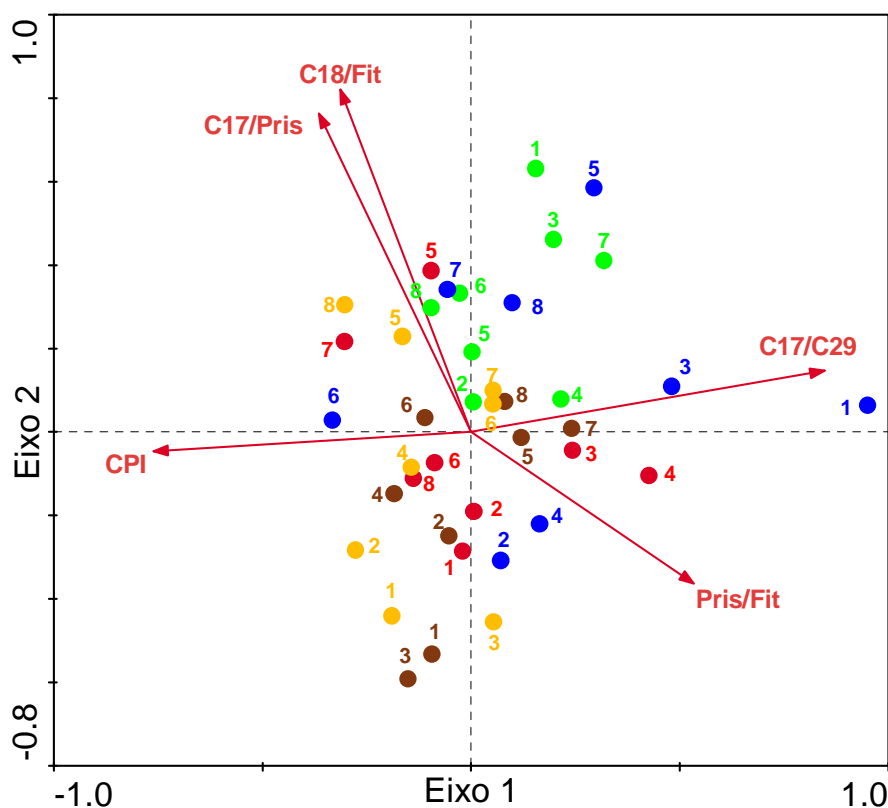


Figura 3.8 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual de *n*-alcenos e isoprenoides, nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal ao longo de um ano, indicando os *scores* (locais) legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

A discriminação entre locais (eixo 2) (Fig. 3.8 - números) entre barlavento e sotavento não é tão evidente pois há mistura dos oito locais em torno do eixo 2, embora na parte negativa se agrupe SG, LG, PT, VM e OL, principalmente nos meses de Inverno (I e II) e Outono, enquanto que na parte positiva do eixo 2 estão representadas FR e TV na maioria dos meses. SG no Verão está mais correlacionada com a razão C17/C29 que

apresentou o máximo de 13,83, indicando fortes contributos biogénicos marinhos para a concentração total de *n*-alcanos, por oposição a OL em que os contributos terrestres são mais importantes. O CPI (indicador de hidrocarbonetos do petróleo) nestes dois locais é <1 (0,76 e 0,95, respectivamente para SG e OL pelo que a separação de SG-Verão dos restantes locais se deva maioritariamente à razão C17/C29.

VRSA no Inverno II, embora apresente as maiores concentrações de *n*-alcanos individuais, está relacionada positivamente com as razões C17/Pris e C18/Fit, indicadoras de fontes recentes de contaminação por hidrocarbonetos, tal como FR e TV no Inverno I. SG, PT e TV na Primavera e FR no Verão parecem apresentar contaminações recentes de *n*-alcanos (razões C17/Pris e C18/Fit >1 no eixo 2), sendo o contributo fito e zooplanctónico mais importante que o contributo proveniente de plantas superiores terrestres (C17/C29, eixo 1), por oposição a LG e VM (no Verão) nos quais a razões C17/Pris, C18/Fit e Pris/Fit revelam contaminações mais antigas (<1), com persistência dos isoprenoides, cujas razão Pris/Fit indicam a presença de hidrocarbonetos petrogénicos.

3.3.2 – Distribuição Temporal

A variação temporal refere-se a amostras recolhidas em 2 situações de Inverno consecutivas (Inverno I –Fevereiro de 1996) e Inverno II (Fevereiro de 1997), e outra em 2003 a que se chamou Inverno III. No estudo temporal pretende-se avaliar o efeito da contaminação por hidrocarbonetos do petróleo ao longo do tempo, na costa Sul de Portugal.

A - *n*-alcanos totais e UCM

As concentrações totais de *n*-alcanos (TAlc) ao longo da costa Sul de Portugal nas três situações de Inverno (Tabelas 3.1, 3.6 e 3.7 e Figura 3.9) indicam que o Inverno III apresenta as maiores concentrações. De facto, a concentração de TAlc ao longo da costa diminuiu do Inverno I para o Inverno II, voltando a aumentar no Inverno III, em todos os locais excepto em OL em que a concentração TAlc é superior no Inverno I e em VRSA onde os níveis são superiores no Inverno II ($p < 0,05$).

Tabela 3.7 - Concentração de TAlc, UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$) e razão UCM/TAlc, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da Costa Sul de Portugal, durante o **Inverno III**.

Mês	Local	TAlc	UCM	UCM / TAlc
INVERNO III	SG	10,6 \pm 0,9	50 \pm 8	5
	LG	8,7 \pm 1,4	59 \pm 9	7
	PT	14,1 \pm 2,8	80 \pm 9	6
	VM	38,3 \pm 6,7	205 \pm 57	5
	FR	6,9 \pm 0,8	86 \pm 17	12
	OL	14,0 \pm 1,3	172 \pm 12	12
	TV	10,5 \pm 1,6	80 \pm 8	8
	VRSA	16,6 \pm 2,7	72 \pm 12	4

VM é o local onde a concentração total de *n*-alcanos é significativamente superior à dos restantes locais (Inverno I, II e III), seguido de OL (Inverno I e III) e VRSA (Inverno II e III). Os níveis de TAlc em FR não variaram significativamente ao longo do tempo (entre 3,6 \pm 0,5 e 6,9 \pm 0,8 $\mu\text{g/g ph}$), enquanto que em SG, LG e TV a concentração de TAlc é inferior nos dois primeiros Invernos ($p < 0,05$).

Contrariamente ao observado para os TAlc, as concentrações médias de UCM ao longo da costa decrescem do Inverno I para o III, onde se registam os menores níveis de UCM. No entanto, em VRSA tal como observado para TAlc, é no Inverno II que se

registra o máximo de concentração de UCM ($776 \pm 51 \mu\text{g/g ph}$). A concentração de UCM em PT, FR e OL no Inverno III é mais elevada que no Inverno II, sugerindo um *input* petrogénico nestes locais.

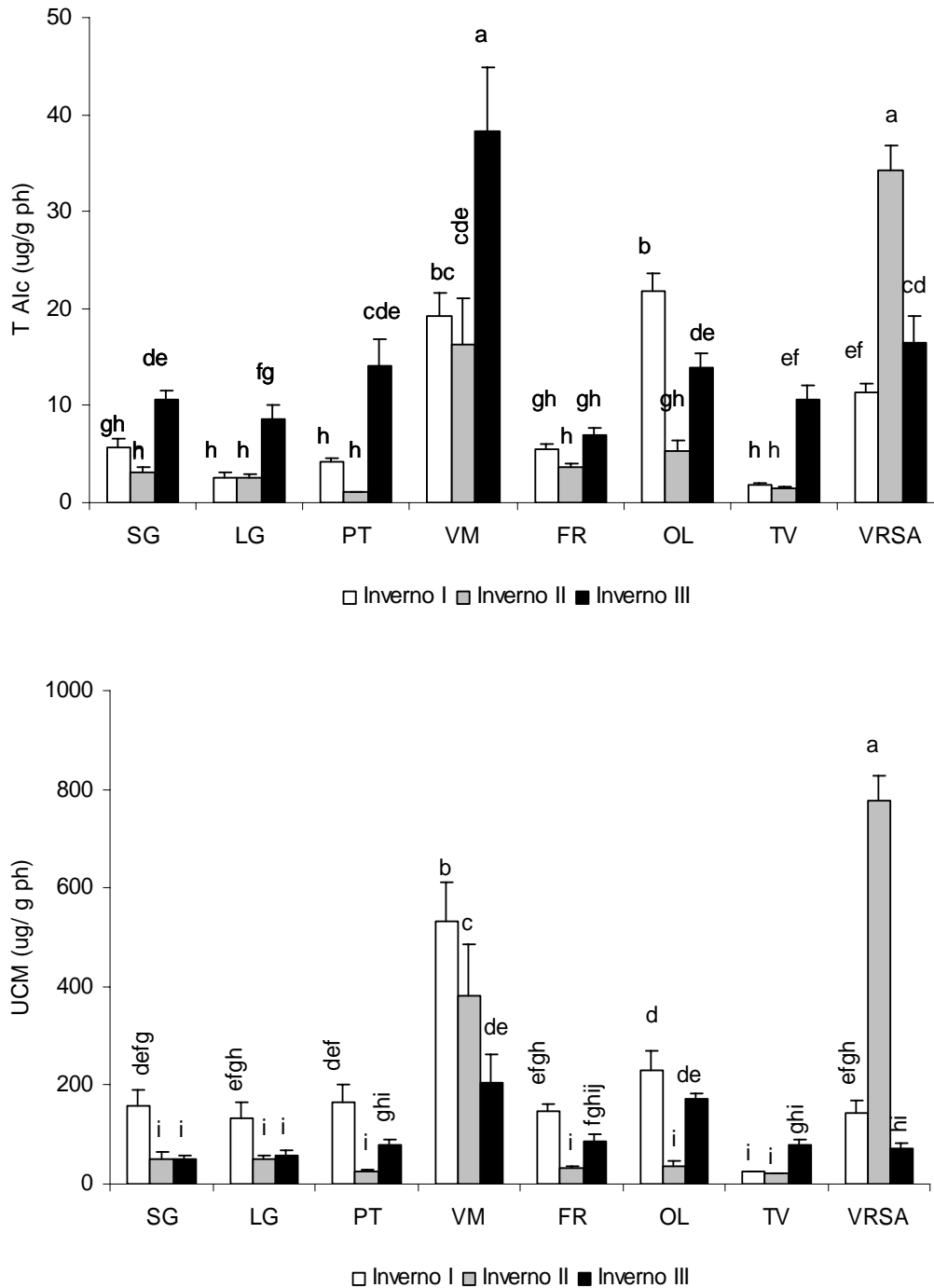


Figura 3.9 - Concentração total de *n*-alcanos e UCM (média \pm desvio padrão) ($\mu\text{g/g ph}$), em mexilhões *M. galloprovincialis* ao longo da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test $p < 0,05$).

Razão UCM/TALc

A razão UCM/TALc calculada para os mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal no Inverno III é apresentada na Tab. 3.7. Neste mês a proporção entre a concentração de hidrocarbonetos não resolvidos e resolvidos é inferior à dos outros (Tab. 3.1 e 3.6), devido às elevadas concentrações de TALc e à relativamente baixa concentração de UCM, particularmente em SG e LG. Comparativamente aos Invernos anteriores, a razão UCM/TALc no Inverno III nos diferentes locais é inferior, reflectido concentrações de UCM e TALc mais semelhantes entre si, e tal como para os Invernos anteriores de carácter crónico e de origem petrolífera.

Quando se aplica a análise de componentes principais aos dados de TALc, UCM e razão UCM/TALc obtidos durante as três situações de Inverno (Fig. 3.10) verifica-se que há uma separação clara entre os três Invernos. O eixo 1 separa na zona negativa os Invernos II e III, enquanto os dados do Inverno I se distribuem em redor da origem. O eixo 2 separa o Inverno III (zona positiva) dos Invernos I e II (zona negativa).

É ainda de salientar que VM no Inverno III está mais correlacionada com a concentração de TALc do que com a razão UCM/TALc, enquanto que VRSA no Inverno II se relaciona principalmente com a concentração de UCM (eixo 1). Os locais que se correlacionam melhor com a razão UCM/TALc são SG, LG, PT e FR no Inverno I, onde esta razão atinge os valores mais elevados.

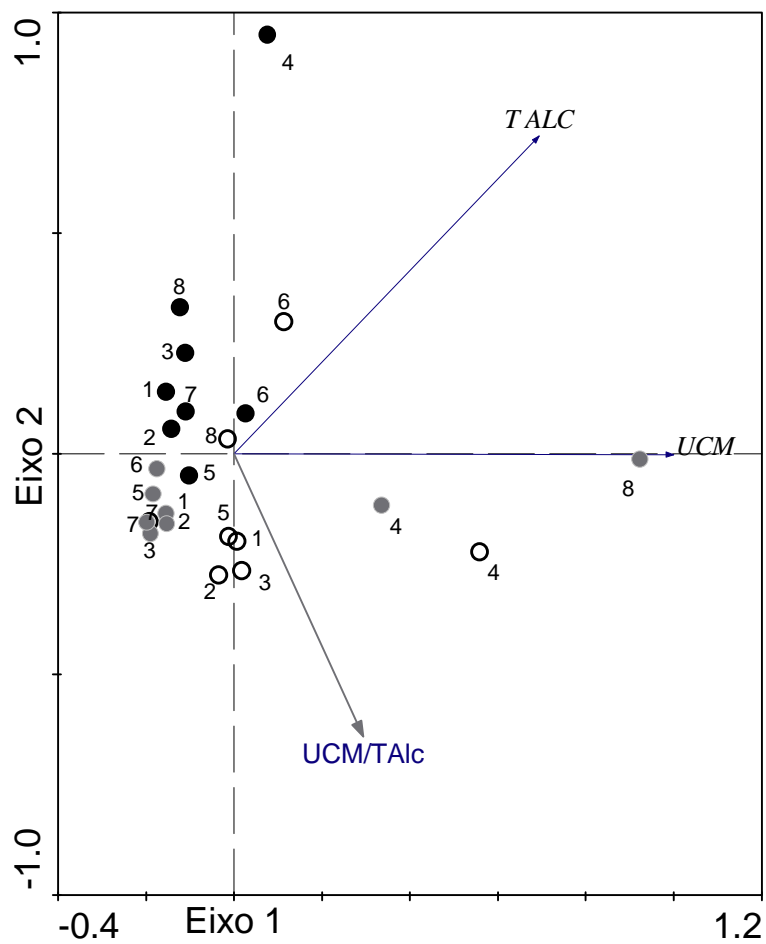


Figura 3.10 - Análise de componentes principais (PCA) da concentração total de *n*-alcanos, UCM e razão UCM/TAIc em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante a distribuição temporal. (o - Inverno I; • - Inverno II; • - Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

B - *n*-alcanos individuais e isoprenoides

Os resultados relativos à concentração individual nos *n*-alcanos e isoprenoides em mexilhões *M. galloprovincialis* durante o Inverno III, ao longo de oito locais da costa Sul de Portugal, estão representados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Concentração individual dos hidrocarbonetos *n*-alcanos e isoprenoides (média ± dp) (ng/g ph) e razões de diagnóstico calculadas, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno III**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO III								
C14	300 ± 76	301 ± 101	109 ± 13	165 ± 19	424 ± 58	68 ± 6	60 ± 10	568 ± 51
C15	295 ± 53	135 ± 11	98 ± 21	200 ± 42	95 ± 13	144 ± 26	34 ± 4	192 ± 24
C16	164 ± 10	82 ± 14	118 ± 21	176 ± 37	152 ± 31	226 ± 19	72 ± 10	281 ± 40
C17	319 ± 60	134 ± 22	147 ± 38	407 ± 94	192 ± 28	285 ± 63	138 ± 34	505 ± 66
Pristano	1229 ± 140	245 ± 33	306 ± 34	442 ± 73	431 ± 71	391 ± 58	570 ± 142	541 ± 72
C18	220 ± 18	197 ± 13	114 ± 11	431 ± 114	245 ± 38	383 ± 60	185 ± 44	1159 ± 177
Fitano	707 ± 97	312 ± 42	243 ± 33	532 ± 134	415 ± 70	374 ± 51	361 ± 92	1100 ± 122
C19	618 ± 123	232 ± 24	520 ± 103	827 ± 190	470 ± 110	316 ± 76	357 ± 53	2269 ± 417
C20	777 ± 41	709 ± 82	430 ± 109	969 ± 248	450 ± 66	239 ± 40	638 ± 130	2653 ± 569
C21	868 ± 126	818 ± 130	431 ± 106	2054 ± 369	514 ± 111	844 ± 111	607 ± 102	1891 ± 441
C22	1236 ± 42	1212 ± 121	545 ± 118	3198 ± 754	591 ± 103	738 ± 95	566 ± 126	1904 ± 381
C23	1344 ± 166	1038 ± 163	1092 ± 229	4874 ± 1156	800 ± 214	1364 ± 252	507 ± 57	1295 ± 279
C24	911 ± 70	717 ± 115	820 ± 212	4395 ± 1077	576 ± 149	1373 ± 265	500 ± 53	1122 ± 63
C25	625 ± 203	556 ± 134	799 ± 107	7151 ± 1855	473 ± 96	1706 ± 227	478 ± 96	743 ± 187
C26	609 ± 69	371 ± 103	1341 ± 114	8745 ± 1151	229 ± 42	1551 ± 189	793 ± 86	304 ± 74
C27	410 ± 91	310 ± 68	1108 ± 269	2353 ± 540	411 ± 64	1201 ± 196	672 ± 148	339 ± 82
C28	493 ± 87	292 ± 55	937 ± 121	643 ± 141	262 ± 30	1091 ± 146	873 ± 209	247 ± 21
C29	520 ± 147	328 ± 91	1051 ± 258	425 ± 100	221 ± 35	1169 ± 270	1312 ± 76	248 ± 55
C30	293 ± 65	318 ± 52	1012 ± 174	366 ± 67	220 ± 43	1074 ± 122	1142 ± 240	291 ± 18
C31	358 ± 33	459 ± 72	1193 ± 214	404 ± 66	285 ± 27	360*	947 ± 169	348 ± 71
C32	101 ± 22	208 ± 29	918 ± 166	199 ± 42	134 ± 26	n.d.	364 ± 90	195 ± 37
C33	50 ± 11	54 ± 10	964 ± 227	140 ± 24	73 ± 16	n.d.	165 ± 41	n.d.
C34	40 ± 9	134 ± 26	451*	64 ± 9	39*	n.d.	75 ± 15	n.d.
C35	39 ± 9	65 ± 9	106*	42 ± 5	27*	n.d.	46 ± 4	n.d.
C36	n.d.	n.d.	112*	n.d.	49*	n.d.	35*	n.d.
TAlc	10592±900	8669±1353	14080±2834	38229±6651	6872±795	13952±1260	10546±1632	16553±2672
Pris/Fit	1,74	0,79	1,26	0,83	1,04	1,05	1,58	0,49
C17/Pris	0,26	0,55	0,48	0,92	0,45	0,73	0,24	0,93
C18/Fit	0,31	0,63	0,47	0,81	0,59	1,02	0,51	1,05
C17/C29	0,61	0,41	0,14	0,96	0,87	0,24	0,10	2,04
CPI	1,06	0,91	1,09	0,98	1,06	1,10	0,99	0,90
H. principal (%)	C23 (13)	C22 (14)	C26 (10)	C26 (23)	C23 (12)	C25 (12)	C29 (12)	C20 (16)

TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice Preferência Carbono): $(\sum nC15-C35)/(\sum nC14-C36)$; * : somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal (% do total).

Comparativamente ao Inverno I (Tab. 3.2) e Inverno II (Tab. 3.6), os resultados mostram que as concentrações individuais dos *n*-alcanos, na maioria dos casos é inferior no Inverno II que no Inverno I, aumentado em 6 dos locais no Inverno III, onde se registaram os valores mais elevados.

A distribuição dos *n*-alcanos pares e ímpares parece ser relativamente homogénea em SG, LG e FR embora SG apresente picos de pristano, fitano e C23 (*n*-alcano principal). A distribuição das concentrações dos *n*-alcanos individuais em PT, VM, OL e VRSA apresentam uma moda entre nos *n*-alcanos de elevado peso molecular que oscila entre o C26-C31, C21-C27, C23-C30 e C18-C24, respectivamente, tal como ocorreu nos Invernos I e II, indicadores de inputs de origem terrestre e petrogénica. No entanto, no Inverno III os *n*-alcanos de baixo peso molecular de origem marinha (C15, C17 e C19) não são dominantes em nenhum local, sendo a sua concentração relativamente semelhante. Os *n*-alcanos principais detectados no Inverno III são mais semelhantes aos detectados no Inverno II (*n*-alcanos de elevado peso molecular) do que aos do Inverno I, onde se regista predomínio de *n*-alcanos de baixo peso molecular, assim como de isoprenoides.

Razão C17/C29

No Inverno III a razão C17/C29 que identifica a partição entre *inputs* biogénicos marinho e *inputs* biogénicos terrestres, foi <1 para a maioria dos locais (entre 0,10 e 0,96), à excepção de VRSA onde a concentração de C17 foi superior à de C29 (razão 2,04). Deste modo a contribuição de *n*-alcanos de origem terrestre para a concentração total de hidrocarbonetos parece ser mais importante que a de origem marinha, tal como no Inverno II (Tab. 3.6). No Inverno I (Tab. 3.2) o predomínio de *n*-alcanos marinhos é evidente nos locais mais a barlavento que a sotavento, onde predominam os *n*-alcanos biogénicos de origem em plantas superiores terrestres.

CPI

O índice de preferência de carbono ($\Sigma n\text{-Cimpar}/\Sigma n\text{-Cpar}$) calculado para os diferentes locais durante o Inverno III é semelhante aos Invernos anteriores (Tab 3.2 e 3.6), ou seja, é muito próximo de 1, indicador da presença de compostos do petróleo. Os valores deste índice variaram entre 0,91 (LG) e 1,10 (OL).

Isoprenoides

Ao longo do Inverno III não houve predomínio claro dos isoprenoides em relação aos *n*-alcanos. Embora a concentração de pristano em SG tenha sido a máxima registado neste mês (Tab. 3.8), a razão Pris/Fit é semelhante à de PT e TV. Tal como observado para o CPI, a razão Pris/Fit oscila em volta de 1 (0,49 a 1,74), indicando uma vez mais origens petrogénicas de hidrocarbonetos, em toda a costa. Valores semelhantes de Pris/Fit foram detectados nos Invernos anteriores. Do mesmo modo as razões C17/Pris e C18/Fit foram sempre inferiores a 1 em toda a costa (excepto em OL e VRSA: 1,02 e 1,05 respectivamente) reflectido o carácter persistente dos isoprenoides ramificados em relação aos lineares, características de contaminações antigas. A variação das razões Pris/Fit, C17/Pris e C18/Fit durante os três Invernos, nos diferentes locais, não indicam alterações significativas ao longo do tempo.

Ao aplicar a análise de correspondência canónica (CCA) aos dados de *n*-alcanos individuais, isoprenoides e razões diagnóstico calculadas para todos os locais e para os três Invernos (Tab. 3.2; 3.6 e 3.8), obtém-se os gráficos representados nas Figuras 3.11 e 3.12, nos quais os eixos 1 e 2 explicam 42,2% da variância dos locais e *n*-alcanos e 79,9% da variância dos vectores.

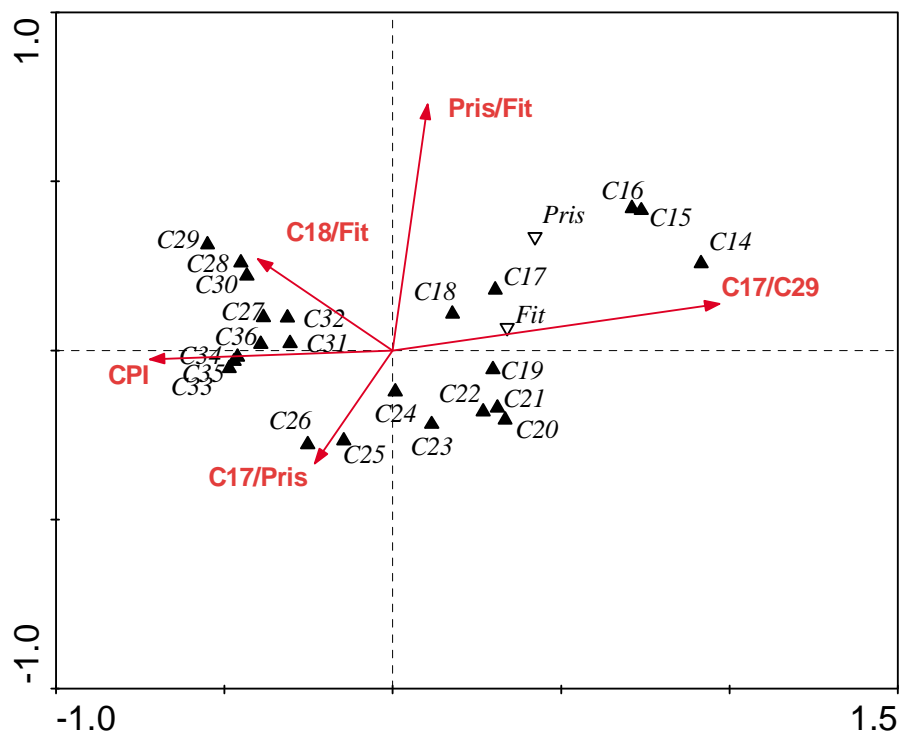


Figura 3.11 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos *n*-alcanos e de isoprenoídes em mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, durante os três Invernos, indicando os *loadings* no Eixo 1 e 2.

Como se pode observar, o eixo 1 da Fig. 3.11 separa os compostos de elevado peso molecular (C25-C36) (zona negativa) dos de baixo peso molecular (C14-C22) (zona positiva), que se relacionam predominantemente com o CPI e razão C17/C29, respectivamente. O eixo 2 correlaciona os hidrocarbonetos principalmente em relação à razão Prs/Fit (zona positiva) e à razão C17/Prs (zona negativa). A representação gráfica dos scores relativos aos locais (Fig. 3.12), mostra uma separação, no eixo 1, entre os três Invernos principalmente devido às razões C17/C29 e Prs/Fit (parte positiva), em SG, LG, PT, VM e TV, enquanto que a zona negativa separa os Invernos em termos de CPI, C18/Fit e C17/Prs, maioritariamente nos Invernos II e III. O eixo 2 separa na zona positiva a maioria dos locais do Inverno I, enquanto que na zona

negativa do eixo estão representadas a maioria dos locais do Inverno II e III, devido à razão C17/Pris.

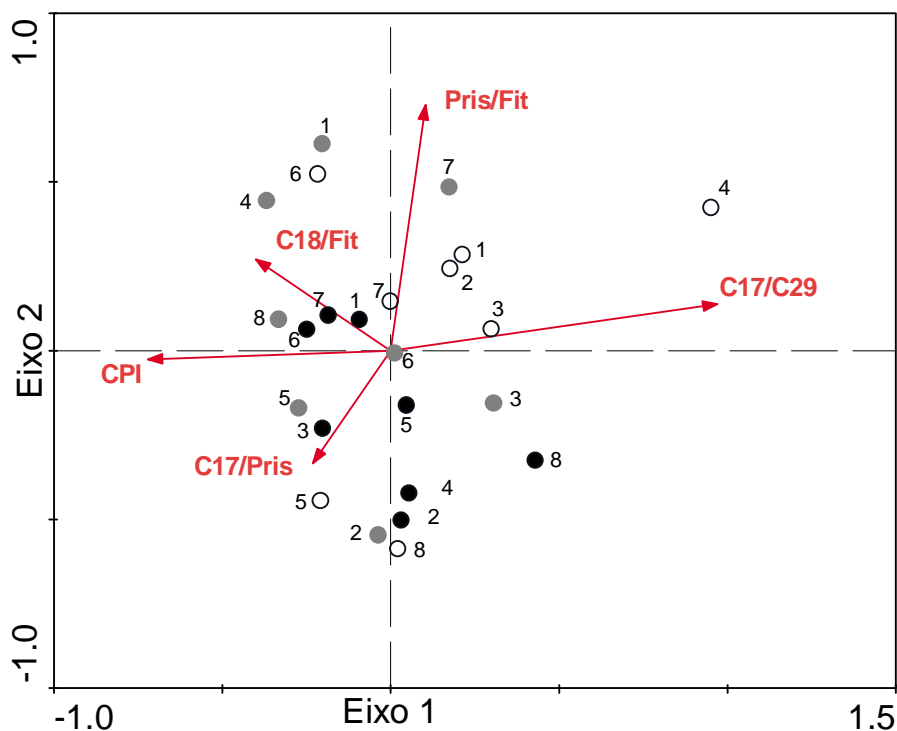


Figura 3.12 - Análise canônica de correspondência (CCA) da concentração individual de *n*-alcanos e isoprenoides, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, durante três Invernos. (o - Inverno I; • - Inverno II; • - Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

3.4 – DISCUSSÃO

A avaliação da contaminação por hidrocarbonetos alifáticos do petróleo na costa Sul de Portugal incluiu diferentes abordagens como a avaliação anual, em que se analisaram mexilhões recolhidos durante um ano consecutivo e a variação temporal, onde se deu ênfase à evolução da contaminação em três situações de Inverno (duas consecutivas e uma passados 6 anos). Os locais de amostragem incluíram pontos expostos ao Oceano

Atlântico, assim como locais mais confinados, protegidos pelas ilhas barreira da Ria Formosa, onde a circulação de água é menos acentuada. O estudo da fracção alifática dos hidrocarbonetos do petróleo é importante pois fornece informação sobre a origem (petrogénica vs biogénica e/ou autóctone vs alóctone) dos hidrocarbonetos, sobre a extensão da sua degradação ambiental e sobre a persistência deste tipo de compostos nos organismos marinhos. Tem sido largamente utilizada na caracterização da evolução da contaminação devido a acidentes com petroleiros, como em monitorizações ambientais em zonas costeiras, em vários pontos do Globo (Burns e Smith, 1981; Bernard *et al.*, 1995; Boehm *et al.*, 1996; Vasquez *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2001; Tolosa *et al.*, 2005). Nos locais onde se estudou a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo nos vários compartimentos bióticos e abióticos em simultâneo, a concentração de hidrocarbonetos nos organismos reflectia a encontrada no ambiente quer em termos de quantidade quer em termos de perfil característico dos hidrocarbonetos (Vasquez *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2001; Tolosa *et al.*, 2005).

A concentração de TAlc em mexilhões recolhidos nos vários locais da costa Sul de Portugal variou entre $1,1 \pm 0,1$ e $34,3 \pm 2,6$ $\mu\text{g/g ph}$ (mediana 3,7) no ciclo anual (Fig. 3.1 e 3.2; Tab. 3.1) e entre $1,1 \pm 0,1$ e $38,3 \pm 6,7$ $\mu\text{g/g ph}$ (mediana 7,8) no ciclo temporal (Fig. 3.9; Tab. 3.1 e 3.7), sendo da mesma ordem de grandeza dos encontrados em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos na costa NW de Portugal ($8 - 33,7$ $\mu\text{g/g ph}$) (Lima *et al.*, 2007), nos canais de Veneza ($7,8 - 40,6$ $\mu\text{g/g ph}$ em locais mais expostos no Mar Adriático e entre $16 - 26,2$ $\mu\text{g/g ph}$ em locais mais confinados), numa zona cuja contaminação é crónica (Wetzel e Van Vleet, 2004), assim como em Nápoles ($0,6 - 48$ $\mu\text{g/g ph}$) (Amodio-Cocchieri e Cirillo, 2003) e em mexilhões *M. edulis* nos

canais cronicamente afectados da Dinamarca (7,5 – 108,8 $\mu\text{g/g ph}$) (Granby e Spliid, 1995) (ver Tab. 1.3 – Capítulo 1).

Os níveis mínimos de TAlc detectados nos mexilhões da costa Sul de Portugal são superiores aos encontrados em áreas cronicamente expostas a hidrocarbonetos como resultado das actividades urbanas e industriais na costa da Galiza (0,13 – 0,83 $\mu\text{g/g ph}$) (Porte *et al.*, 2001a) e superiores aos níveis detectados em amêijoas (*Circentia callipyga*) e ostras (*Pinctada radiata*; *Saccostrea cucullata*) recolhidas no Golfo Pérsico e Golfo de Omã, 10 anos após a Guerra do Golfo (0,16 – 1,3 $\mu\text{g/g ph}$) (Tolosa *et al.*, 2005) em que a concentração de hidrocarbonetos nos tecidos dos organismos decresceu no período de 10 anos para concentrações comparáveis a locais não contaminados, ocorrendo no entanto picos de contaminação em locais específicos devido a acidentes mais recentes, não relacionados com os derrames provocados durante a Guerra do Golfo. É ainda de salientar que a concentração média anual de TAlc na maioria dos locais e meses é $< 7 \mu\text{g/g ph}$ (Fig. 3.2; Tab. 3.1 e 3.7). Valores semelhantes (entre <1 e $7 \mu\text{g/g ph}$) são considerados níveis basais de contaminação (Tab. 1.3- Cap. 1) (UNEP, 1988; Hermida-Ameijeiras *et al.*, 1994 a, b; Burt e Ebell, 1995) ou níveis de contaminação moderada, principalmente devido a actividades náuticas, como refere Carro *et al.* (2006), em mexilhões *M. galloprovincialis* (0,88 – 5,1 $\mu\text{g/g ph}$) da costa da Galiza recolhidos 1 e 3 meses após o acidente com o “*Prestige*”. Estes autores concluíram que a costa estava medianamente contaminada principalmente devido a origens crónicas características de tráfego marítimo, e em menor escala, ao impacto de derrame do “*Prestige*”.

Além dos picos de *n*-alcanos existem também isoprenoides pristano e fitano e uma mistura complexa não resolvida (UCM) de hidrocarbonetos alifáticos cíclicos e

ramificados, característicos de hidrocarbonetos do petróleo (Porte e Albaigés, 1993; Granby e Spliid, 1995; Solé *et al.*, 1996; Wetzel e Van Vleet, 2004; Tolosa *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2006). Nesta dissertação, todos os cromatogramas apresentavam UCM entre os *n*-alcanos C14 e C36 (Fig. 3.3), cujas concentrações variaram entre 18 ± 3 e 776 ± 52 $\mu\text{g/g ph}$ (mediana 62) no ciclo anual (Fig. 3.4 e 3.5; Tab. 3.1) e entre 21 ± 2 e 776 ± 52 $\mu\text{g/g ph}$ (mediana 83) no período temporal (Inverno I, II e III) (Fig. 3.9; Tab. 3.1 e 3.7), indicando a presença de produtos de origem petrogénica degradados (Solé *et al.*, 1996). A concentração mediana de UCM em mexilhões da costa Sul de Portugal enquadra-se, tal como os TAlc, nos valores reportados para mexilhões da costa Catalã ($1,72 - 98,8$ $\mu\text{g/g ph}$) (Porte e Albaigés, 1993), dos canais da Dinamarca ($5 - 99$) (Granby e Spliid, 1995) e são superiores aos encontrados em mexilhões da Galiza ($1,5 - 39,7$ $\mu\text{g/g ph}$) (Porte *et al.*, 2001 a) e em ostras e amêijoas recolhidas no Golfo Pérsico ($1,8 - 26$ $\mu\text{g/g ph}$) (Tolosa *et al.*, 2005) (ver Tab. 1.3 – Capítulo 1). Ao longo da costa Sul de Portugal, os níveis médios de UCM detectados nos mexilhões são na maioria dos meses e locais <100 $\mu\text{g/g ph}$, ocorrendo também um intervalo de concentrações superiores, que oscilam entre 129 ± 25 e 531 ± 82 $\mu\text{g/g ph}$. O valor máximo foi detectado em VRSA no Inverno II (776 ± 52 $\mu\text{g/g ph}$). Tais valores máximos são comparáveis às concentrações máximas encontradas em mexilhões da costa NW de Portugal (434 $\mu\text{g/g ph}$) (Lima *et al.*, 2007), de Veneza (312 $\mu\text{g/g ph}$) (Livingstone *et al.*, 1995), e do Reino Unido (795 $\mu\text{g/g ph}$) (Rowland *et al.*, 2001), em locais cronicamente contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (Tab. 1.3 – Cap.1).

Ao longo deste estudo, a proporção entre a fracção não resolvida (UCM) e a fracção resolvida dos hidrocarbonetos (TAlc) foi também calculada, de forma a estudar o grau de degradação ambiental dos hidrocarbonetos alifáticos. Assim, durante a distribuição

anual, a razão UCM/TAlc variou entre 5 e 51 (mediana 19) nos diferentes locais (Tab. 3.1), enquanto que no Inverno III variou entre 4 e 12 (mediana 6) (Tab. 3.1 e 3.7), indicando diferentes graus de degradação ambiental. Estes resultados são semelhantes aos dos mexilhões da costa da Galiza recolhidos três meses (13-46) e três anos (11-86) após o derrame do “Aegean Sea”, respectivamente (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 a b). Assim, a degradação ambiental da contaminação por petróleo é diferente ao longo da costa Sul de Portugal, desde pouco degradado (razão UCM/TAlc <10) (Inverno III), reflectindo uma contaminação recente (Solé *et al.*, 1996), a degradação mediana UCM/TAlc entre 10 e 20) verificada na maioria dos locais, e ainda, a situações de degradação muito acentuada (UCM/TAlc >20) em LG e PT no Inverno I (51 e 40, respectivamente), indicando que a contaminação tinha uma origem mais antiga (Clark e Blumer, 1967).

A distribuição sazonal das concentrações totais de TAlc, UCM e razão UCM/TAlc ao longo do ciclo anual e temporal (Fig. 3.6 e 3.10), indica que a concentração dos hidrocarbonetos alifáticos no Inverno I e Outono são significativamente diferentes dos restantes meses, embora a concentração média no Inverno II seja superior à detectada na Primavera e no Verão, principalmente devido aos níveis detectados em VRSA. A análise dos componentes principais (Fig. 3.6) separa este local, conferindo-lhe assim uma característica de excepção. O Inverno I desta-se ainda pela razão UCM/TAlc, por existir maior degradação, relativamente aos outros meses, identificando o local OL, por apresentar a menor razão UCM/TAlc.

A evolução temporal da contaminação por hidrocarbonetos alifáticos (Fig. 3.9, 3.10) indica um aumento da concentração de TAlc do Inverno I para o III, com um máximo em VM, enquanto que a UCM diminui do Inverno I para o III, sendo este semelhante ao

Inverno II. O facto de haver maiores proporções de TAlc em conjunto com UCM menores ($UCM/TAlc < 10$), sugere contaminações recentes, em que ainda não houve degradação ambiental acentuada. Este comportamento revela que a contaminação no Inverno III é mais recente que nos Invernos precedentes (Fig. 3.10), destacando VRSA no Inverno II devido às maiores concentrações de TAlc e UCM, e VM no Inverno III, por apresentar o valor máximo e menor degradação ambiental ($UCM/TAlc = 5$). A variação espacial da concentração de TAlc e UCM revela que VM e OL, seguidos de PT (Fig. 3.6 e 3.10) são os locais onde se registam os valores mais elevados de contaminação, ao longo do ano e também no estudo temporal, não considerando VRSA no Inverno II. Os locais que apresentam menores níveis de contaminação média são FR e TV, enquanto que os restantes apresentam níveis de contaminação intermédia. A análise PCA destaca também VM, OL e PT no ciclo anual (Fig. 3.6) e VM e OL no ciclo temporal (Fig. 3.10), como os locais mais contaminados, separando também estes locais sazonalmente.

A distribuição individual das concentrações dos *n*-alcanos (C14 ao C36), dos isoprenoides (pristano e fitano), assim como de algumas razões diagnósticas (Pris/Fit, C17/Pris, C18/Fit, CPI e C17/C29) foram usadas para identificar a origem e o tipo da contaminação ao longo da costa Sul de Portugal.

A contaminação por hidrocarbonetos na costa Sul de Portugal é devido predominantemente a fontes petrogénicas, tal como reflectido no hidrocarboneto principal (principalmente pristano e *n*-alcanos pares como o C16 e C18, ou o C22 e C26), no CPI e na razão Pris/Fit, ambas menores ou semelhantes a 1 (petrogénico) em toda a costa e durante o período estudado (anual e temporal). De facto, o CPI oscila entre 0,7 e 1,2 (mediana 0,89) no período anual (Tab. 3.2 a 3.6) e entre 0,91 e 1,10

(mediana 1,1) no Inverno III (Tab. 3.8), enquanto que a razão Pris/Fit oscila entre 0,6 e 2,3 (mediana 1,1) e entre 0,49 e 1,74 (mediana 1,04), respectivamente no ciclo anual e temporal. Dados semelhantes foram detectados em mexilhões da costa da Galiza, onde se avaliou a contaminação ambiental por hidrocarbonetos, a qual foi devido principalmente a fontes petrogénicas (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 a b; Carro *et al.*, 2006) (Tab. 1.3). Outro modo de avaliar a presença e degradação de hidrocarbonetos petrogénicos é através das razões C17/Pris e C18/Fit, em que valores baixos revelam a influência de processos de degradação biológica e ambiental (evaporação, fotodegradação) sobre os alcanos lineares comparativamente aos ramificados e sugerem a presença de óleos degradados (Wang *et al.*, 1999 a; Mille *et al.*, 2006). Neste trabalho, as razões C17/Pris e C18/Fit apresentaram na maioria das vezes valores <1 , corroborando assim as características petrogénicas da contaminação ($CPI < 1$, Pris/Fit < 1), sendo estes valores menores no Inverno I relativamente ao II e III, confirmando também que a contaminação é mais recente no Inverno III.

Além das fontes petrogénicas, os hidrocarbonetos sintetizados por organismos (hidrocarbonetos biogénicos) também podem estar presentes no ambiente, cuja fracção alifática é a predominante e ocorrem em várias espécies de animais e plantas marinhas e terrestres (Youngblood e Blumer, 1973; Peña-Méndez *et al.*, 2001). O perfil da distribuição da concentração individual dos *n*-alcanos e as razões de diagnóstico, são também utilizados para separar a origem (petrogénica e/ou biogénica), e identificar o tipo autóctone e/ou alóctone dos hidrocarbonetos biogénicos. Assim, embora os hidrocarbonetos pares e os isoprenoides (ambos característicos de *inputs* petrogénicos) tenham sido identificados como os hidrocarbonetos principal na maioria dos locais ($CPI < 1$), em alguns locais o CPI foi superior a 1. O valor deste índice pode ser superior a 1

tanto devido a um predomínio de *n*-alcanos ímpares de baixo peso molecular (C15, C17, C19), como devido a um predomínio de *n*-alcanos ímpares de elevado peso molecular (C27,C29,C31), indicando em ambas as situações *n*-alcanos de origem biogénica. O C17 foi o hidrocarboneto principal em FR e OL na Primavera, representando 20 e 17%, respectivamente, da concentração total de *n*-alcanos. A razão C17/C29 (indica o predomínio autóctone ou alóctone das fontes biogénicas) nestes locais (3,74 e 3,19 respectivamente), indica que a contribuição de hidrocarbonetos de fontes marinhas é superior à terrestre. Valores elevados desta razão foram também identificados em VM (Inverno I: 4,11), na Primavera em todos os locais, mas particularmente elevadas em SG (5,14) e TV(5,9) (nestes dois locais, o C17 não foi o *n*-alcano principal, mas apresentou concentrações superiores ao C29), e no Verão em SG (13,83) e VRSA (3,9). Esta predominância do C17 em relação ao C29 pode estar relacionado com fenómenos de *upwelling* e de elevada produtividade, principalmente na Primavera e no Verão em SG.

O pristano também tem origem biológica, derivado quer de reacções pós-deposicionais envolvendo a hidrogenação catalítica dos fitadienos e/ou resultante da oxidação (pristano) ou redução (fitano) da cadeia lateral de fitol da clorofila (Mille *et al.*, 2006). Nestes casos, a concentração de pristano representa entre 25 a 60% da concentração total dos hidrocarbonetos alifáticos, e os valores da razão Pris/Fit oscila entre 15 e 96 (Snedaker *et al.*,1995; Carro *et al.*, 2006). Nesta dissertação, embora o pristano tenha sido dominante em algumas situações (10 e os 22% da concentração total), a razão Pris/Fit e a razão C17/Pris (respectivamente 1,22 a 2,25 anual e 0,23 a 0,79 temporal) nesses locais, são características de fontes petrogénicas de pristano (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 a b; Carro *et al.*, 2006).

Os valores de CPI >1 podem também ser devidos a *n*-alcanos ímpares de elevado peso molecular (C27, C29 e C31) característico de plantas superiores terrestres, reflectido na razão C17/C29 <1. De facto, o C29 e o C31 foram os hidrocarbonetos principais em FR, OL e VRSA (8, 10 e 8% respectivamente) no Inverno I, em SG no Outono (11%) e em VM, FR e VRSA (respectivamente 18, 13 e 14%) no Inverno II. No Inverno I a razão C17/C29 foi <1 em FR, OL, TV e VRSA; no Verão a origem terrestre foi mais acentuada somente em VM e OL; no Outono e Inverno II a origem terrestre foi predominante (<1) excepto em LG, PT e TV. Tais predomínios terrestres nos Invernos I e II e Outono podem estar relacionados com a ocorrência de detritos vegetais terrestres para o meio marinho.

O comportamento dos *n*-alcanos individuais e isoprenoides descrito anteriormente é corroborado pela análise canónica de correspondência (CCA) que separa no período anual (Fig. 3.7 e 3.8) a Primavera e o Verão no quadrante superior direito em termos de razão C17/C29 >1 e *n*-alcanos de baixo peso molecular, em oposição aos Invernos I e II e Outono que se associam mais a valores mais baixos de C17/C29 (<1) e a *n*-alcanos ímpares de peso molecular superior (C24-C36). Esta projecção do CPI e razão C17/C29 é semelhante à verificada no estudo temporal (Fig. 3.11 e 3.12), confirmando que os Invernos II e III são diferentes do Inverno I (cujas maioria dos pontos se situa no eixo (+1) e (+2)), mais relacionado com *n*-alcanos de baixo peso molecular.

As fontes de hidrocarbonetos do petróleo para o ambiente marinho costeiro estão associadas ao tráfego marítimo, actividades portuárias e marinas, ocorrências das chuvas, ocorrências urbanas industriais/domésticas, derrames acidentais com petroleiros e/ou manobras de de-lastro, lavagem de tanques, e doca-seca (UNEP, 2002). De facto, tal como referido no Capítulo 1, a costa Portuguesa é atravessada por algumas

das principais e mais movimentadas rotas de navios de e para o Mediterrâneo, Norte da Europa, África e América (Fig. 1.5 - Cap. 1) e sofre vários acidentes por ano (Fig. 1.6 e 1.7). Assim, as concentrações de TAlc e UCM registadas na costa Algarvia podem, em grande parte, estar associadas a fenómenos acidentais deste tipo. Por outro lado, os pontos de amostragem situaram-se em zonas de portos de pesca, comerciais ou de recreio, com dimensões e volume tráfego diferentes, expostas ao oceano ou mais confinadas (Ria Formosa), ou na foz de rios, apresentando por conseguinte contaminações petrogénicas diferentes, desde concentrações consideradas basais, até concentrações características de locais cronicamente afectados. VM e OL, eram à data da amostragem, respectivamente, a maior marina (1000 embarcações) e o maior porto de pesca (2000 embarcações; 13500 ton de pescado (DGPA, 2004) do Algarve (IPNT, 2004), contribuindo assim para o elevado tráfego marítimo costeiro, que aumenta consideravelmente no Verão. VM apresentava no seu anteporto, cerca de 30-40 pequenos barcos de pesca que se encontravam ancorados até ao início dos anos 2000. Por outro lado, a ribeira de Quarteira pode também ser uma fonte pontual de hidrocarbonetos provenientes de escorrências urbanas e das estradas, uma vez que desagua no canal de acesso à marina. O porto de OL, situado no interior da Ria Formosa, tinha em 1996-1997 um porto de abrigo para pequenas embarcações de recreio, que tal como o elevado número de barcos de pesca, contribui para a contaminação do meio. Além disso, nos canais principais de navegação circulam ainda navios de grande porte, de transporte de combustível e gás, de e para os depósitos do porto comercial de FR e do aeroporto, assim como duas companhias de transporte de passageiros para as ilhas barreira, além do elevado número de pequenas embarcações particulares. As actividades portuárias associadas (abastecimento de combustível, estaleiros, oficinas) e respectivas escorrências, também contribuem para as fontes de

contaminação por hidrocarbonetos do petróleo. Outras fontes de hidrocarbonetos podem ser as escorrências das estradas, urbanas e industriais e saneamento básico (ETARs).

As escorrências das chuvas, com conseqüente “lavagem” das estradas, e a proximidade a cursos de água, podem também contribuir para os teores de hidrocarbonetos alifáticos acumulados pelos mexilhões. As fontes principais de água doce para a região do Algarve são os rios Arade, Gilão e Guadiana, que em conjunto com ribeiras de menor dimensão e toda a bacia de drenagem da região, podem contribuir com inputs sazonais de hidrocarbonetos para o meio, provenientes das escorrências das estradas (e/ou pontes) e lixiviação dos solos. Assim, o máximo registado em VRSA no Inverno II talvez possa ser devido a algum derrame recente associado a um período de chuva intensa. De facto a pluviosidade média anual no Inverno II (843,1 mm) é superior à média anual para a região (696,4 mm) (<http://snrih.pt>), estando VRSA sujeita ainda ao impacto de aquaculturas, da ponte internacional, e do tráfego de embarcações de pesca e recreio, de VRSA e Espanha. No Outono e Invernos a presença de C29 nos tecidos dos mexilhões é mais pronunciada ($C17/C29 < 1$) e pode também estar associada a detritos e matéria vegetal terrestre que é arrastada pelo rio desde zonas mais interiores até à foz. Do mesmo modo, o aumento das concentrações de TAlc em toda a costa no Inverno III, com um valor máximo em VM ($38,3 \pm 6,7 \mu\text{g/g ph}$) semelhante ao registado em VRSA no Inverno II ($34,3 \geq 2,5 \mu\text{g/g ph}$) também pode estar associado a períodos de elevada pluviosidade, embora no Inverno III os níveis de precipitação média (547 mm) tenham sido inferiores ao níveis média para a região (696 mm). Dado que a precipitação registada no Inverno III por si só não explica o aumento acentuado, e generalizado ao longo da costa, das concentrações de hidrocarbonetos, e o facto da razão UCM/TAlc (< 7) indicar origens recentes e pouco degradadas de hidrocarbonetos, talvez tenha ocorrido algum derrame não acidental na costa pela passagem de petroleiros de e para o

Mediterrâneo (deslastro, lavagem de tanques, etc), tendo sido posteriormente trazido até à zona costeira pelas correntes.

Do mesmo modo que os factores ambientais influenciam a acumulação dos hidrocarbonetos, o estado de saúde dos organismos, períodos de carência/abundância de alimento, fase do ciclo reprodutivo, etc., também pode alterar as concentrações totais nos tecidos. Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos lipofílicos, que se acumulam preferencialmente nos tecidos ricos em lípidos, como glândula digestiva e as gónadas. No mexilhão *M. galloprovincialis* a desova começa na Primavera, coincidindo com o aumento da temperatura e da clorofila *a* (Cáceres-Martinez e Figueras, 1988, David *et al*, 2008). Depois da desova massiva, uma rápida gametogénese ocorre, restabelecendo a condição de desova, que dá origem a posturas aleatórias e mais fracas no início do Verão, após o qual os indivíduos se encontram na fase de repouso ou indiferenciação sexual (Cancio *et al*, 1999; David *et al*, 2008). Deste modo, o decréscimo da concentração de TAlc e UCM no período da Primavera e Verão talvez se deva ao efeito de “depuração” ocorrido com a libertação das células sexuais e consequente decréscimo dos teores lipídicos totais (Cancio *et al*, 1999) que, antes de se repetir no principio do Verão se deverão restabelecer, podendo por conseguinte aumentar de novo as concentrações de hidrocarbonetos no Verão, como se veio a verificar. Nos meses de Primavera e Verão ocorre também a maior abundância de alimento, que se reflecte na razão $C17/C19 >1$, indicadora de hidrocarbonetos biogénicos marinhos, fito e zooplanctónicos.

3.5 - CONCLUSÕES

A concentração total de hidrocarbonetos alifáticos nos mexilhões da costa Sul de Portugal permite classificar a zona em três classes: (1) pouco contaminada ou com concentrações de níveis basais (TAlc < 2 µg/g ph; UCM < 10 µg/g ph) (Hermida-Ameijeiras *et al.*, 1994 a, b; Burt e Ebell, 1995), (2) medianamente contaminada devido a actividades náuticas (TAlc 7 a 10 µg/g ph; UCM 10 a 20 µg/g ph) (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000; Carro *et al.*, 2006), e (3) afectadas cronicamente (TAlc >10; UCM > 20 µg/g ph) associado a portos e marinas com tráfego marítimo acentuado, transfeça de combustível de e para os depósitos de armazenamento, e escorrências industriais/domésticas e das estradas (Granby e Spliid, 1995; Wetzel e Van Vleet, 2004). FR e TV inserem-se na primeira categoria enquanto que SG, LG, PT apresentam níveis de hidrocarbonetos alifáticos medianos, inserindo-se portanto na segunda categoria. VM e OL são os locais que apresentam características crónicas de contaminação por hidrocarbonetos. Em VRSA, a mediana das concentrações de TAlc (4) e UCM (74) até ao Outono são típicas de locais medianamente contaminados, pelo que o pico de contaminação registado no Inverno II (cerca de 8,5 vezes superiores aos valores medianos de TAlc e 12 vezes superior à mediana de UCM), se deva a situações anormais de pluviosidade, com conseqüente aumento do caudal do Rio Guadiana e/ou a algum tipo de derrame ocorrido neste período.

A variação sazonal (anual e temporal) revela menor contaminação na Primavera e no Verão, e mais elevada no Outono e Invernos I e II (se se incluir VRSA) e III. A contaminação ao longo do tempo na costa Sul de Portugal decresce segundo a ordem Inverno II < I < III, sendo mais antiga no Inverno I (UCM/TAlc > 20), seguida do Inverno II (UCM/TAlc entre 10-20) e mais recente no Inverno III (UCM/TAlc < 10).

A análise da distribuição individual dos *n*-alcanos e isoprenoides corrobora a origem essencialmente petrogénica da contaminação nos mexilhões (*n*-alcanos pares; CPI e Pris/Fit <1), e dos seus tipos de degradação, indicando tanto contaminações antigas (C17/Pris e C18/Fit <1) como mais recentes (C17/Pris e C18/Fit ≥ 1). A origem biogénica (CPI >1) é marinha na Primavera e Verão (C17/C29 >1), e terrestre no Outono e Inverno (I, II e III) (C17/C29 <1).

**4 – DISTRIBUIÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS (PAHs) EM MEXILHÕES *Mytilus galloprovincialis* DA COSTA
SUL DE PORTUGAL**

4.1 – INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são contaminantes orgânicos persistentes, tendo sido encontrados em todos os compartimentos bióticos: atmosfera, solos e sedimentos, coluna de água e seres vivos terrestres e aquáticos. São ubíquos e fazem parte dos contaminantes mais estudados nos programas ambientais, em conjunto com os PCBs (bifenis policlorados), devido à sua toxicidade, persistência e acumulação ao longo das cadeias alimentares (Solé, 2000 a). São tóxicos, reactivos e alguns são considerados cancerígenos, como o benzo(a)pireno..

Os PAHs são formados por dois ou mais anéis de benzeno e podem ser originados pela transformação da matéria orgânica durante a formação do petróleo (petrogénicos); transformação de certas classes de compostos orgânicos nos solos ou sedimentos (diagénicos), ou pela síntese directa por organismos (biogénicos), combustão incompleta ou pirólise dos combustíveis fósseis (pirolíticos).

As duas principais fontes de PAHs para o ambiente são os combustíveis fósseis, principalmente o crude ou petróleo, e a combustão incompleta de material orgânico (OSPAR 2001). Os PAHs são emitidos na produção de energia, processos industriais térmicos (indústria do alumínio, ferro e aço, e os processos de combustão das refinarias e da coqueria da siderurgia e metalurgia, que utilizam carvão ou coque), fornos de combustão, incineradoras de resíduos, fornos de combustão de madeira industriais (produção de papel) ou domésticos, motores de veículos, actividades náuticas e portuárias, etc., assim como a partir de fontes naturais (vulcões, fogos florestais). Os PAHs são também os principais componentes do asfalto (estradas), alcatrão (pneus), betume e produtos semelhantes utilizados na preservação e protecção de madeiras, como o creosoto (OSPAR, 2001).

Para as principais fontes de contaminação os padrões composicionais dos PAHs também são diferentes. Algumas razões de diagnóstico entre PAHs individuais têm sido utilizadas como indicadores da origem dos PAHs, e têm por base a temperatura de formação dos compostos. A formação do petróleo requer temperaturas baixas, na qual a transformação da matéria orgânica origina PAHs de 2 ou 3 anéis de benzeno (como o naftaleno, o antraceno ou o fenantreno) e uma elevada proporção de compostos alquilados, característicos de PAHs de origem petrogénica. Por outro lado, elevadas temperaturas de combustão resultam em compostos de 4, 5 ou 6 anéis (como o benzo(a)antraceno, o criseno, o benzo(a)pireno, o benzo(g,h,i)perileno ou o indeno(1,2,3cd)pireno) e quantidades mínimas de compostos alquilados (Yunker *et al.*, 2002 a,b). Deste modo cada fonte individual de PAHs é caracterizada por um padrão molecular específico (Burns *et al.*, 1997; Baumard *et al.*, 1999a; Yunker *et al.*, 2002 a,b, Barreira *et al.*, 2007c). Como os isómeros de PAHs têm as mesmas características físico-químicas, têm também um padrão semelhante de diluição e distribuição com a matéria particulada e outros compartimentos ambientais (Dickhut *et al.*, 2000; Oros e Ross, 2005). Assim, determinadas proporções entre pares de isómeros de PAHs têm sido aplicadas como traçadores químicos distintos ou indicadores de diagnóstico, de modo a diferenciar entre possíveis fontes de PAHs em amostras ambientais. Tais proporções ou razões podem ser úteis na distinção entre *inputs* petrogénicos e pirolíticos, quer sejam derivados da combustão do petróleo ou produtos refinados (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2001a), ou derivados da combustão de biomassa (fogos florestais, lareiras, incineradoras, carvão) (Oros e Ross, 2004).

Adicionalmente, os padrões composicionais de PAHs duma fonte pura ou de amostras ambientais ricas em PAHs de uma única fonte podem ser consideradas como “impressões digitais” ou “assinaturas” dos PAHs existentes. A análise multivariada

PLS (Partial Least Squares) tem sido utilizada na identificação de fontes de contaminação de PAHs pela projecção das assinaturas em conjuntos de dados ambientais, quantificando a variância que pode ser explicada ou prevista por cada fonte (Mugde 2002; Page *et al*, 2005; Barreira *et al*, 2007 b,c).

É objectivo deste Capítulo avaliar a distribuição espacial e sazonal da concentração de PAHs nos mexilhões *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal. Pretende-se ainda caracterizar a costa Sul de Portugal em termos de maior ou menor grau de contaminação, assim como identificar as fontes e origens dos PAHs, através da análise das razões diagnóstico entre pares de isómeros, e da utilização de assinaturas tipo.

4.2 – MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a evolução da contaminação ambiental por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), foram recolhidas amostras de mexilhão *M. galloprovincialis* em 8 locais da costa Sul de Portugal: Sagres (SG), Lagos (LG), Portimão (PT), Vilamoura (VM), Faro (FR), Olhão (OL), Tavira (TV) e Vila Real de Santo António (VRSA) (Fig. 2.1; Cap. 2). As amostragens decorreram durante um ano consecutivo (distribuição anual): Inverno I (Fevereiro de 1996); Primavera (Abril de 1996), Verão (Agosto de 1996), Outono (Outubro de 1997) e Inverno II (Fevereiro de 1997) e pontualmente 6 anos depois (distribuição temporal): Inverno III (Dezembro 2003).

Os PAHs foram extraídos por Soxhlet em amostras compostas de 3 indivíduos ($n=3$) durante 24 h, com uma mistura de *n*-hexano/diclorometano, fraccionados por

cromatografia de adsorção com sílica-alumina, e quantificadas por HPLC-UV. Foi utilizado o padrão EPA 610 (16 PAHs), cujos limites de detecção variaram entre 0,01 e 0,24 ng/g. A quantificação dos PAHs foi validada pela análise de material de referência SRM 2977 (NIST), com taxas de recuperação >80 - 112%. Não foram detectados PAHs nos ensaios em branco. Os dados são expressos em ng/g ph e são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças da concentração de PAHs nos tecidos dos mexilhões entre locais e meses foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) às quais foi efectuado o teste de Duncan, para um nível de significância de 0,05, através do programa Statistica 5.0. De modo a determinar os padrões gerais da distribuição espacial e sazonal dos PAHs, foi efectuada uma Análise de Correspondência Canónica (CCA), utilizando o programa Canoco (Ter Braak, 1995). Para avaliar as fontes e origens dos PAHs nos tecidos dos mexilhões, o perfil de distribuição dos PAHs individuais foi comparado com “assinaturas” retiradas da bibliografia, através do programa Umetrics, por intermédio da análise PLS (Partial Least Squares).

4.3 - RESULTADOS

4.3.1 - Distribuição Anual

A - PAHs Totais

A concentração total de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (TPAHs) (ng/g ph) é a soma da concentração individual de cada um dos 16 compostos analisados nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em oito locais da costa Sul de Portugal, durante um ano consecutivo e são apresentados na Figura 4.1. Os resultados mostram a

presença generalizada de PAHs nos mexilhões ao longo da costa Sul de Portugal, sendo o Inverno I e o Outono os meses que apresentam maiores de concentrações médias mensais de TPAHs em toda a costa (1464 ± 819 e 1101 ± 299 ng/g ph, respectivamente), enquanto que as menores concentrações médias mensais se registam na Primavera (776 ± 320 ng/g ph), Verão (808 ± 379 ng/g ph) e Inverno II (675 ± 426 ng/g ph) e são semelhantes entre si.

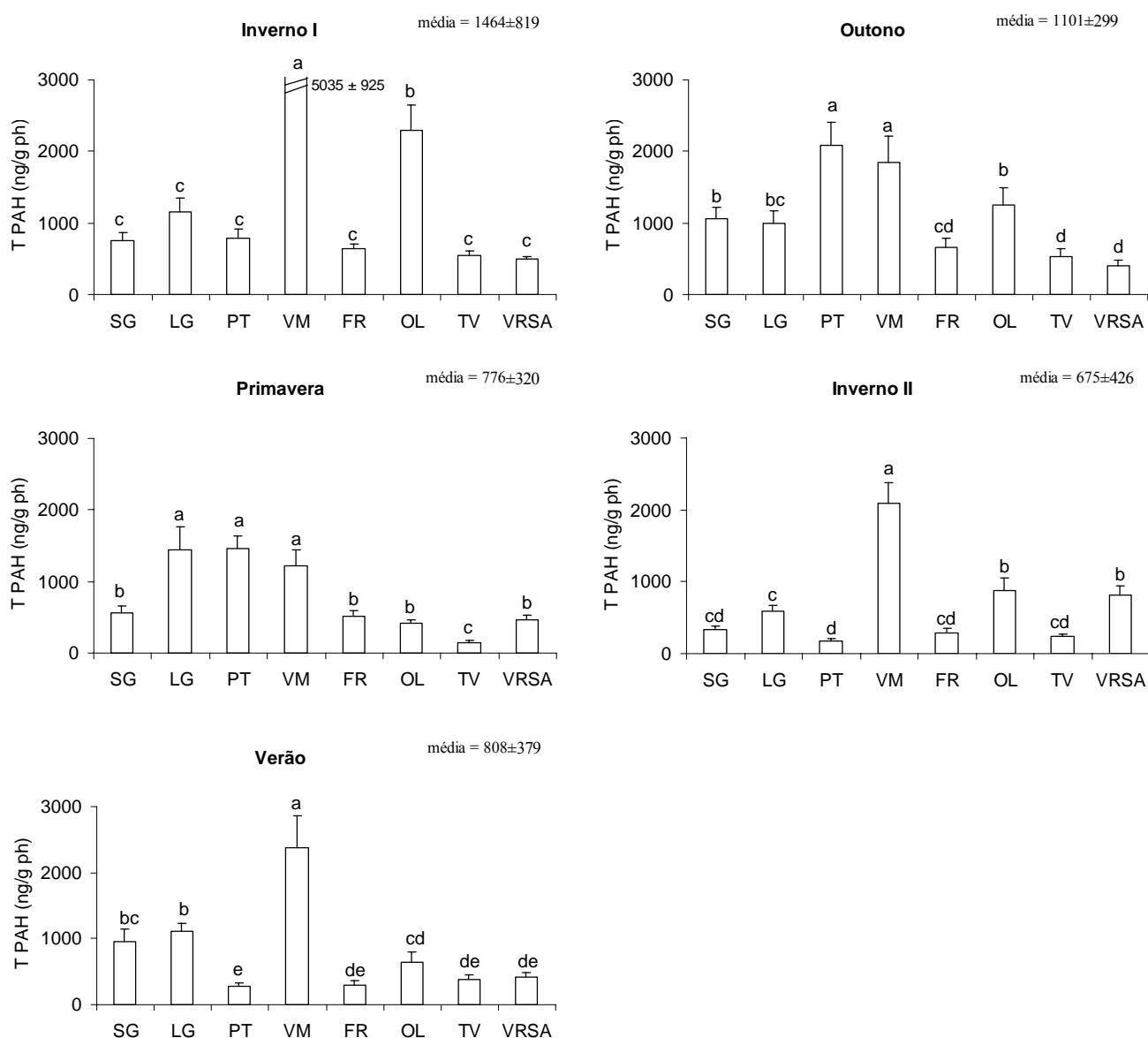


Figura 4.1 - Variação espacial da concentração total de PAHs (média \pm desvio padrão) (ng/g ph) em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes meses, ao longo da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

No Inverno I a concentração de TPAH é superior em VM (5035±925 ng/g ph) e OL (2291±363 ng/g ph) ($p<0,05$) relativamente aos restantes locais, onde os teores de TPAH são semelhantes, oscilando entre 1159±192 (LG) e 499±23 ng/g ph (VRSA). Na Primavera os teores de TPAH são superiores e semelhantes em LG, PT e VM (1438±323; 1453±190 e 1220±232 ng/g ph, respectivamente ($p<0,05$)) seguidos de SG, FR, OL e VRSA (entre 557±106 e 417±48 ng/g ph). TV apresenta as concentrações de TPAH mínimas (145±27 ng/g ph). No que diz respeito ao Verão os níveis de TPAH são superiores em VM e LG, cujas concentrações (2376 ± 486 e 1112 ± 123 ng/g ph, respectivamente) são estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). SG apresenta concentrações de TPAH (959±179 ng/g ph) semelhantes às encontradas em LG (1112±123 ng/g ph) e OL (649±149 ng/g ph).

A concentração mínima de TPAH no Verão foi detectada em PT (277±53 ng/g ph) ($p<0,05$). Quanto ao Outono verifica-se que a concentração máxima de TPAH se regista em PT (2083±324 ng/g ph) seguida de VM (2376±486 ng/g ph). Embora semelhantes entre si, os níveis totais de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em PT e VM são diferentes dos registados nos restantes locais, cujos valores oscilam entre 1062±156 ng/g ph em SG e 404±74 ng/g ph em VRSA, que é o local onde a concentração de TPAH é mínima, mas semelhantes aos níveis encontrados em TV (536±107 ng/g ph) e FR (652±128 ng/g ph) ($p<0,05$). Relativamente ao Inverno I e II, VM é o local que apresenta níveis superiores de TPAH (2094±290 ng/g ph) ($p<0,05$) seguida de OL e VRSA, que apresentam concentrações de TPAH semelhantes (883±166 e 814±123 ng/g ph, respectivamente) ($p>0,05$). Nos restantes locais da costa os valores de TPAH oscilam entre 585±91 ng/g ph (LG) e 174±26 ng/g ph (PT) ($p<0,05$). Por outro lado, a distribuição sazonal da concentração total de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos diferentes locais da costa Sul de Portugal (Fig. 4.2) é < 1000 ng/g ph na maioria dos

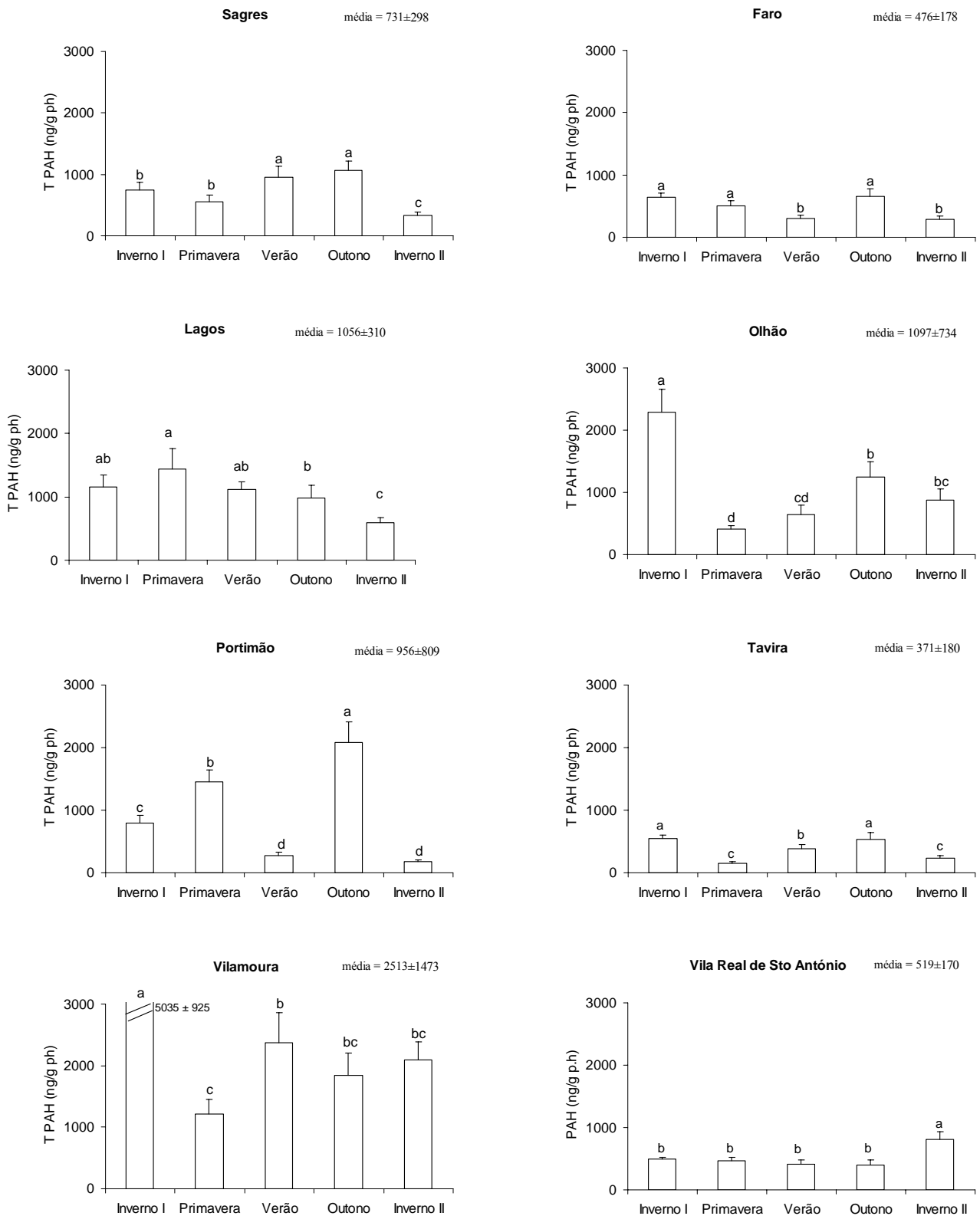


Figura 4.2 - Variação sazonal da concentração total de PAHs (média ± desvio padrão) (ng/g ph) em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

locais e meses excepto em VM onde a concentração de TPAH é sempre superior a 1000 ng/g ph durante todo o ano (média 2513 ± 1473 ng/g ph). LG, PT e OL apresentam concentrações médias anuais de TPAH semelhantes (1056 ± 310 , 956 ± 809 e 1097 ± 734 ng/g ph, respectivamente). FR (476 ± 178 ng/g ph) e TV (371 ± 180 ng/g ph) são os locais que apresentam as menores concentrações de TPAH ao longo do período amostrado. O Inverno I e/ou o Outono são os meses em que a concentração de TPAH é superior à dos outros meses, particularmente em SG (1062 ± 156 ng/g ph), PT (2083 ± 324 ng/g ph), VM (5035 ± 925 ng/g ph), FR (652 ± 128 ng/g ph), OL (2291 ± 363 ng/g ph) e TV (536 ± 107 ng/g ph), decrescendo no Inverno II para o nível mínimo de TPAH, em todos os locais excepto em LG onde os níveis de TPAH foram superiores na Primavera 1438 ± 323 ng/g ph) e em VRSA em que os teores de TPAH foram superiores no Inverno II (814 ± 123 ng/g ph).

Uma vez que os PAHs de 2 e 3 anéis (do naftaleno até ao antraceno) são relacionados com derrames de hidrocarbonetos petrogénicos (como o diesel e o fuel) (Burt e Ebell, 1995) enquanto que os PAHs de 4, 5 e 6 anéis são primariamente produzidos como resultado das combustão de combustíveis fósseis (Burt e Ebell, 1995), representa-se na Figura 4.3 a distribuição dos PAHs individuais por número de anéis aromáticos, como percentagem da concentração total. Ao longo da costa Sul de Portugal, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos formados por 4 anéis são predominantes, essencialmente devido ao benzo(a)antraceno que por si só representa entre 20 (PT no Verão) e 44% (SG no Inverno II) da concentração total de PAHs. No entanto, o criseno é também predominante em alguns locais, principalmente no Verão em SG (23%), PT (63%), VM (28%) e OL (34%).

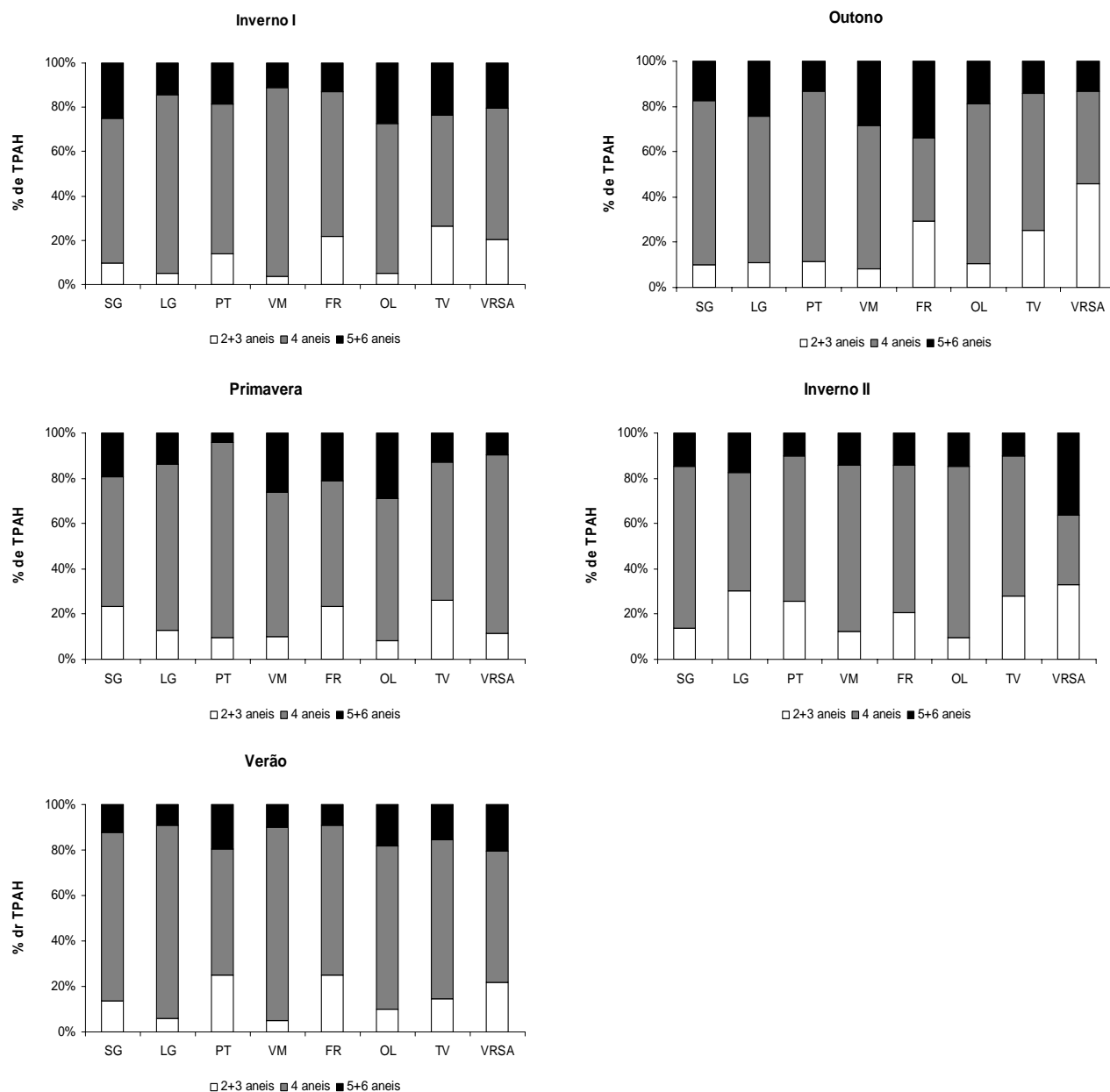


Figura 4.3 - Padrão de distribuição dos PAHs, agrupados por número de anéis aromáticos, em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal.

Quando considerado todo o conjunto de dados, estes dois compostos juntamente com os outros PAHs de 4 anéis aromáticos, representam em média 66% da concentração total de PAHs, enquanto que os de 2+3 anéis e 5+6 anéis representam apenas 17 e 18%, respectivamente. No entanto, os locais com menor concentração de PAHs de 2+3 anéis são LG, VM e OL na maioria dos meses, com aumento da proporção de PAHs com 4

anéis, enquanto que FR, TV e VRSA são os locais em que em cada mês a proporção de PAHs de 2+3 anéis é superior, atingindo o máximo (46%) em VRSA no Outono, devido ao acenafteno que foi o principal PAH detectado. No Inverno II o acenafteno foi também o principal PAH em VRSA, no entanto a distribuição de PAHs por anéis é equitativa (33, 31, 36% respectivamente para 2+3, 4 e 5+6 anéis). O mesmo padrão foi detectado em FR no Outono (30, 36 e 34%) mas neste caso o principal PAH foi o criseno, de 4 anéis aromáticos. Os PAHs de 5+6 anéis apresentam percentagens que oscilam entre 4% (PT na Primavera), 34% (FR no Outono) e 36% (VRSA no Inverno II), mas nenhum dos PAHs de 5 e 6 anéis é predominante em relação aos restantes.

Na Figura 4.4 apresenta-se a variação média sazonal (Fig 4.4A) a espacial (Fig. 4.4B) do teor em lípidos nos tecidos dos mexilhões recolhidos em vários locais da costa Sul de Portugal, expressos em percentagem do peso fresco da amostra. Como se pode verificar, não existe diferença sazonal no teor em lípidos, que oscila entre $3,6 \pm 1,2$ e $4,2 \pm 1,4$ % durante o ano, mas parece existir uma diferença espacial, na medida em que a percentagem de lípidos nos mexilhões de SG e OL ($5,4 \pm 1,1$ e $5,2 \pm 0,9$ %, respectivamente) é superior à dos restantes locais.

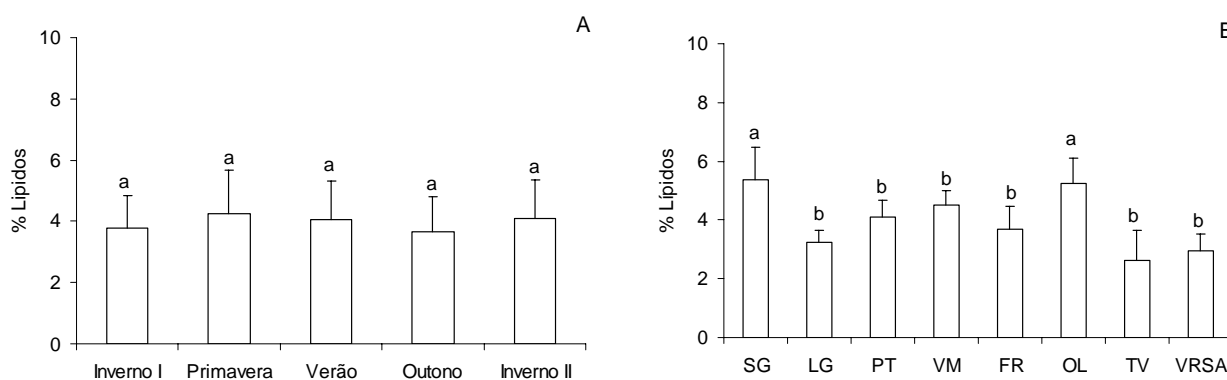


Figura 4.4 - Variação sazonal (A) e espacial (B) do teor em lípidos (% do peso fresco) nos tecidos moles dos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da costa Sul de Portugal (média \pm desvio padrão) (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

Embora os PAHs sejam altamente lipofílicos, o que favorece a sua acumulação em tecidos ricos em lípidos, o local onde a concentração de PAHs (VM) é mais elevada, não é o mesmo onde se regista o maior teor em lípidos (SG). Assim, embora a acumulação de PAHs nos tecidos dos mexilhões apresente uma tendência crescente com o teor em lípidos, esta não é significativa ($r = 0,27$) (Fig. 4.5).

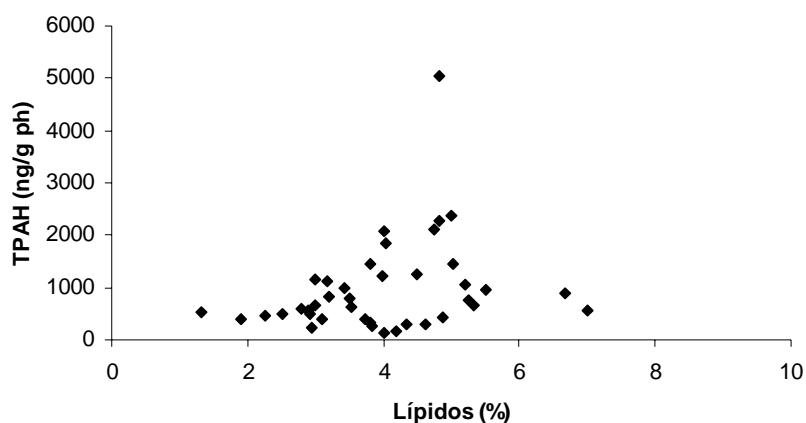


Figura 4.5 - Relação entre a concentração total de PAHs e o teor em lípidos nos tecidos moles dos mexilhões *M. galloprovincialis*, considerando todo o conjunto de dados ($n=40$).

B - PAHs Individuais

As concentrações individuais dos 16 PAHs analisados (ng/g peso húmido) (média \pm desvio padrão) nos tecidos de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal estão representados nas Tabela 4.1 a 4.5. Os resultados mostram, tal como para os hidrocarbonetos alifáticos, uma contaminação generalizada pelos 16 PAHs referenciados pela USA EPA como tóxicos, mutagénicos e cancerígenos. De uma maneira geral os compostos entre o fluoranteno (Flu) e o benzo(b)fluoranteno (BbF) são os compostos predominantes, atingindo-se o máximo

Tabela 4.1 - Concentração individual de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no Inverno I.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO I								
Naftaleno (N)	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,3	17,1 ± 2,6	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	17,6 ± 3,3	2,4 ± 0,3
Acenaftileno (Acftil)	12,8 ± 2,2	7,8 ± 1,1	16,6 ± 2,3	40,1 ± 9,2	4,2 ± 0,5	37,7 ± 6,1	30,5 ± 5,0	10,1 ± 2,1
Acenafteno (Acften)	33,1 ± 7,2	36,0 ± 8,3	48,9 ± 6,4	63,0 ± 15,9	105,1 ± 3,7	42,7 ± 6,6	85,1 ± 10,0	65,8 ± 6,6
Fluoreno (Flr)	8,6 ± 0,9	5,4 ± 1,2	6,7 ± 1,0	20,8 ± 3,6	10,3 ± 1,8	13,4 ± 2,8	7,4 ± 1,0	8,1 ± 1,6
Fenantreno (Fen)	13,5 ± 2,5	6,2 ± 1,4	16,2 ± 2,3	45,4 ± 9,9	17,9 ± 1,9	22,6 ± 5,3	2,8 ± 0,4	13,9 ± 2,1
Antraceno (Ant)	3,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6	5,4 ± 0,6	20,3 ± 4,7	1,6 ± 0,2	4,5 ± 0,8	4,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3
Fluoranteno (Flu)	50,9 ± 6,5	218,5 ± 42,7	113,4 ± 20,9	1185,5 ± 321,2	50,0 ± 1,7	357,2 ± 27,4	24,6 ± 4,0	27,1 ± 2,7
Pireno (Pir)	71,7 ± 12,5	190,2 ± 27,2	47,5 ± 10,6	309,5 ± 42,2	74,5 ± 12,3	116,2 ± 14,1	36,1 ± 7,1	30,8 ± 4,1
Benzo(a)antraceno (BaA)	235,6 ± 50,9	302,8 ± 68,0	252,4 ± 47,0	2060,2 ± 489,0	202,7 ± 13,2	591,2 ± 125,6	102,9 ± 14,1	150,9 ± 11,4
Criseno (Cris)	129,5 ± 16,5	226,2 ± 46,3	135,4 ± 21,2	769,9 ± 156,5	91,8 ± 19,0	481,9 ± 96,1	115,7 ± 12,1	87,9 ± 14,7
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	120,4 ± 21,5	77,7 ± 3,9	61,7 ± 9,2	261,7 ± 64,2	36,9 ± 7,0	182,3 ± 17,7	69,6 ± 13,1	55,1 ± 12,0
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	15,6 ± 1,3	38,5 ± 5,4	24,1 ± 4,2	39,1 ± 6,7	10,5 ± 1,6	63,6 ± 14,1	18,0 ± 2,3	24,3 ± 5,0
Benzo(a)pireno (BaP)	33,1 ± 7,4	26,9 ± 4,9	50,2 ± 10,5	115,1 ± 30,5	25,2 ± 4,0	337,4 ± 85,2	25,8 ± 3,7	15,9 ± 1,9
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	13,3 ± 1,7	23,7 ± 6,0	10,4 ± 1,5	29,3 ± 3,7	10,3*	2,6*	14,6 ± 1,4	7,2 ± 0,7
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	3,7 ± 0,3	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,4	74,8 ± 11,8	0,4 ± 0,04	28,9 ± 7,3	4,1 ± 1,0	0,3 ± 0,04
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	1,0 ± 0,04	1,1 ± 0,02	1,8 ± 0,2	52,8 ± 10,9	0,4 ± 0,05	10,2 ± 1,3	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,01
TPAH	748 ± 117	1159 ± 192	794 ± 122	5035 ± 925	638 ± 67	2291 ± 363	552 ± 56	499 ± 23
PAH principal (% do total)	BaA (32)	BaA (26)	BaA (32)	BaA (41)	BaA (32)	BaA (26)	Cris (21)	BaA (30)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado

Tabela 4.2 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal na **Primavera**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
PRIMAVERA								
Naftaleno (N)	5,2 ± 0,9	20,6 ± 3,7	21,9 ± 4,7	13,1 ± 3,5	8,3 ± 1,1	5,5 ± 0,8	2,7 ± 0,2	n.d.
Acenaftileno (Acftil)	47,4 ± 5,7	18,2 ± 4,3	27,6 ± 6,1	18,6 ± 2,3	22,6 ± 4,6	1,6 ± 0,2	12,6*	17,3 ± 1,0
Acenafteno (Acften)	57,7 ± 8,0	73,7 ± 7,8	43,1 ± 9,4	64,2 ± 17,3	57,2 ± 13,6	21,0 ± 4,8	14,9 ± 2,6	25,2 ± 1,9
Fluoreno (Flr)	5,1 ± 0,7	19,4 ± 4,6	16,2 ± 3,4	15,4 ± 4,1	5,6 ± 1,2	1,1 ± 0,1	5,3 ± 0,8	3,4 ± 0,8
Fenantreno (Fen)	11,3 ± 1,1	51,2 ± 7,1	17,5 ± 4,3	10,5 ± 2,4	23,6 ± 5,7	6,0 ± 1,0	3,5 ± 0,4	8,5 ± 1,7
Antraceno (Ant)	2,5 ± 0,5	11,1 ± 2,0	15,1 ± 2,0	6,5 ± 1,2	1,4 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,03	0,6 ± 0,02
Fluoranteno (Flu)	26,1 ± 6,9	233,9 ± 45,1	102,6 ± 7,6	191,3 ± 50,6	26,8 ± 7,1	47,9 ± 10,1	16,7 ± 3,1	17,5 ± 3,1
Pireno (Pir)	50,0 ± 13,4	178,9 ± 39,5	51,9 ± 9,4	97,4 ± 23,1	45,8 ± 9,7	23,9 ± 6,1	7,7 ± 1,4	48,2 ± 11,3
Benzo(a)antraceno (BaA)	113,6 ± 27,1	533,5 ± 115,8	193,7 ± 12,4	168,1 ± 38,7	138,3 ± 33,7	52,9 ± 7,7	46,2 ± 9,5	269,4 ± 30,6
Criseno (Cris)	130,1 ± 32,6	149,8 ± 33,1	909,1 ± 182,4	346,7 ± 82,7	69,8 ± 16,6	139,5 ± 17,6	21,5 ± 1,0	42,3 ± 11,0
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	72,3 ± 17,3	74,3 ± 8,8	43,7 ± 9,0	112,7 ± 16,6	44,1 ± 11,3	54,8 ± 11,8	7,8 ± 0,3	31,8 ± 5,7
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	12,4 ± 2,7	85,0*	12,1 ± 1,4	116,6 ± 25,2	15,3 ± 2,9	38,8 ± 2,5	4,7 ± 0,7	10,7 ± 1,6
Benzo(a)pireno (BaP)	12,7 ± 2,4	8,9*	3,4 ± 0,5	35,3 ± 7,0	15,1 ± 3,7	17,9 ± 2,5	3,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	7,9 ± 1,4	10,5 ± 1,6	0,1 ± 0,02	54,0 ± 11,7	25,4 ± 4,1	10,0 ± 1,5	2,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	1,9 ± 0,3	18,8*	1,0 ± 0,2	5,3 ± 0,9	5,8 ± 1,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,04
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	1,1 ± 0,02	6,2 ± 0,02	1,2 ± 0,1	4,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	0,1*	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,04
TPAH	557 ± 106	1438 ± 323	1453 ± 190	1220 ± 232	508 ± 83	417 ± 48	145 ± 27	472 ± 50
PAHs principal (% do total)	Cris (23)	BaA (37)	Cris (63)	Cris (28)	BaA (27)	Cris (34)	BaA (32)	BaA (57)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado; n.d. – não detectado

Tabela 4.3 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Verão**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
VERÃO								
Naftaleno (N)	5,7 ± 0,7	3,8 ± 0,5	7,7 ± 0,8	15,2 ± 2,5	12,3 ± 0,8	n.d.	1,4 ± 0,3	0,2 ± 0,05
Acenaftileno (Acftil)	36,1 ± 9,3	13,1 ± 1,4	22,9*	2,8 ± 0,5	5,5 ± 1,0	n.d.	1,6 ± 0,2	4,9 ± 0,8
Acenafteno (Acften)	49,2 ± 8,5	35,8 ± 4,7	31,0 ± 5,2	56,0 ± 13,5	35,2 ± 9,1	42,0 ± 8,8	43,6 ± 5,9	67,7 ± 16,5
Fluoreno (Flr)	19,9 ± 4,9	4,4 ± 1,1	4,3 ± 0,9	6,4 ± 1,1	6,7 ± 1,4	18,1 ± 4,8	5,3 ± 0,9	4,5 ± 0,8
Fenantreno (Fen)	14,2 ± 2,9	8,4 ± 0,8	3,4 ± 0,6	24,0 ± 5,3	14,5 ± 3,3	2,2 ± 0,2	3,9 ± 0,7	8,6 ± 2,1
Antraceno (Ant)	5,8 ± 1,4	0,8 ± 0,1	4,5 ± 1,0	10,0 ± 1,3	1,2 ± 0,3	3,6 ± 0,6	0,8 ± 0,2	3,1 ± 0,7
Fluoranteno (Flu)	179,9 ± 43,3	90,0 ± 6,4	36,9 ± 8,7	441,4 ± 90,7	27,5 ± 5,1	74,0 ± 14,7	24,7 ± 3,6	12,1 ± 2,4
Pireno (Pir)	164,3 ± 37,5	110,7 ± 9,3	34,7 ± 6,4	144,4 ± 37,9	53,3 ± 11,7	43,1 ± 10,7	44,8 ± 10,7	47,8 ± 5,6
Benzo(a)antraceno (BaA)	257,8 ± 52,7	329,3 ± 59,3	55,8 ± 14,0	953,1 ± 225,3	68,7 ± 13,7	202,1 ± 44,2	123,5 ± 29,1	113,3 ± 28,3
Criseno (Cris)	120,4 ± 26,3	425,7 ± 75,7	34,0 ± 8,4	485,1 ± 96,9	47,8 ± 12,9	157,5 ± 27,6	76,3 ± 16,8	63,0 ± 15,8
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	54,7 ± 9,4	44,6 ± 9,3	30,4 ± 8,1	145,1 ± 25,3	10,6 ± 2,5	46,7 ± 12,1	25,1 ± 5,2	24,7 ± 5,0
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	47,7 ± 8,2	23,5 ± 2,3	17,5 ± 3,1	40,8 ± 10,8	7,2 ± 1,8	34,4 ± 5,8	20,7 ± 4,0	7,3 ± 0,8
Benzo(a)pireno (BaP)	n.d.	n.d.	8,4 ± 2,1	33,0 ± 6,4	7,0 ± 1,0	29,2 ± 6,6	10,3 ± 2,1	40,9 ± 9,5
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	11,5 ± 1,4	21,7*	0,7 ± 0,1	15,0 ± 1,6	0,2 ± 0,1	6,4 ± 0,7	2,4 ± 0,5	7,2 ± 1,1
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	2,2 ± 0,3	11,1 ± 1,9	0,3 ± 0,03	2,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	1,2 ± 0,1	3,7 ± 1,0	0,2 ± 0,02	1,1 ± 0,04	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,02	0,3 ± 0,01	1,3 ± 0,03
TPAH	959 ± 179	1112 ± 123	277 ± 53	2376 ± 486	300 ± 60	649 ± 148	385 ± 72	408 ± 74
PAHs principal (% do total)	BaA (27)	Cris (38)	BaA (20)	BaA (40)	BaA (23)	BaA (31)	BaA (32)	BaA (28)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado; n.d. – não detectado

Tabela 4.4 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Outono**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
OUTONO								
Naftaleno (N)	0,1 ± 0,02	5,3 ± 1,2	46,2 ± 11,0	7,3 ± 1,5	49,2 ± 7,2	14,1*	47,6 ± 6,2	5,9 ± 0,5
Acenaftileno (Acftil)	28,9*	8,0 ± 1,2	46,5 ± 9,3	22,0 ± 3,4	42,4 ± 8,7	17,8 ± 2,7	31,5 ± 5,0	15,8 ± 2,7
Acenafteno (Acften)	57,9 ± 9,9	67,7 ± 9,1	101,4 ± 22,7	83,5 ± 14,0	75,9 ± 10,3	41,7 ± 6,7	27,8 ± 7,8	135,0 ± 13,4
Fluoreno (Flr)	5,4 ± 1,4	13,3 ± 2,5	13,9 ± 3,4	5,6 ± 1,1	7,9 ± 1,4	9,4 ± 1,7	7,9 ± 1,4	8,6 ± 1,9
Fenantreno (Fen)	12,2 ± 2,5	12,0 ± 2,0	27,1 ± 6,5	25,1 ± 6,1	14,9 ± 2,9	30,1 ± 7,0	18,6 ± 4,2	13,9 ± 3,1
Antraceno (Ant)	3,2 ± 0,7	2,1 ± 0,3	5,2 ± 0,9	6,8 ± 1,6	2,4 ± 0,5	17,0 ± 3,5	2,4 ± 0,6	6,2 ± 1,2
Fluoranteno (Flu)	127,0 ± 32,3	37,0 ± 9,2	204,0 ± 27,7	254,8 ± 58,9	5,5 ± 1,2	101,8 ± 12,9	25,2 ± 4,3	39,3 ± 7,7
Pireno (Pir)	197,2 ± 23,0	101,1 ± 23,3	227,1 ± 45,3	157,1 ± 35,8	48,3 ± 11,5	84,4 ± 13,0	44,7 ± 9,7	25,0 ± 7,2
Benzo(a)antraceno (BaA)	311,2 ± 63,1	312,1 ± 66,3	720,3 ± 140,7	541,7 ± 111,4	61,6 ± 14,5	500,3 ± 111,1	181,6 ± 52,4	55,5 ± 14,0
Criseno (Cris)	150,5 ± 36,3	191,0 ± 42,1	417,5 ± 96,5	233,9 ± 49,5	122,0 ± 25,0	201,7 ± 57,3	71,8 ± 13,5	46,1 ± 10,8
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	59,0 ± 12,7	112,3 ± 28,0	135,5 ± 31,9	149,4 ± 32,6	85,1 ± 21,4	127,8 ± 29,8	17,8 ± 3,8	24,5 ± 5,4
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	43,7 ± 10,4	57,3 ± 13,5	51,0 ± 8,5	147,6 ± 33,8	58,2 ± 12,5	37,9 ± 5,7	20,6 ± 4,1	12,4 ± 3,7
Benzo(a)pireno (BaP)	33,5 ± 8,2	47,5 ± 8,0	26,5 ± 4,9	59,3 ± 13,9	42,1 ± 10,3	32,3 ± 5,1	15,6 ± 2,9	4,7 ± 0,7
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	24,3 ± 4,6	16,3 ± 2,5	54,0 ± 10,4	94,1 ± 12,9	30,2 ± 5,6	21,3 ± 3,3	19,6 ± 4,2	8,6 ± 1,6
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	19,2 ± 3,6	2,4 ± 0,3	5,2 ± 1,1	44,2 ± 11,0	5,6 ± 1,2	11,1 ± 1,9	2,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	7,5 ± 1,0	2,8 ± 0,6	1,6 ± 0,3	33,3 ± 8,0	1,8 ± 0,1	4,1 ± 0,3	1,3 ± 0,05	1,0 ± 0,1
TPAH	1062 ± 156	988 ± 191	2083 ± 324	1866 ± 374	652 ± 128	1246 ± 246	536 ± 107	404 ± 74
PAHs principal (% do total)	BaA (29)	BaA (32)	BaA (35)	BaA (29)	Cris (19)	BaA (40)	BaA (34)	Acften (33)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado

Tabela 4.5 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média \pm dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno II**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO II								
Naftaleno (N)	0,4 \pm 0,1	49,2 \pm 9,2	2,3 \pm 0,5	30,6 \pm 3,0	0,3*	0,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	8,2 \pm 1,4
Acenaftileno (Acftil)	7,6 \pm 1,0	56,1 \pm 11,0	9,1 \pm 2,2	31,2 \pm 7,1	n.d.	8,3 \pm 2,1	11,5 \pm 1,4	27,4 \pm 4,1
Acenafteno (Acften)	24,5 \pm 3,0	52,2 \pm 10,4	24,8 \pm 4,5	120,8 \pm 15,2	54,0 \pm 4,2	55,8 \pm 11,4	37,8 \pm 5,4	214,4 \pm 27,8
Fluoreno (Flr)	2,7 \pm 0,5	6,0 \pm 1,5	3,9 \pm 0,9	27,1 \pm 6,1	3,8 \pm 0,8	9,0 \pm 2,3	8,7 \pm 1,4	9,1 \pm 1,7
Fenantreno (Fen)	8,5 \pm 1,7	10,1 \pm 1,7	4,1 \pm 0,6	36,6 \pm 5,6	3,3 \pm 0,4	10,6 \pm 2,9	6,3 \pm 1,5	6,5 \pm 0,9
Antraceno (Ant)	2,0 \pm 0,5	4,0 \pm 0,9	1,4 \pm 0,3	13,2 \pm 2,1	1,0 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4	1,5 \pm 0,3	2,8 \pm 0,4
Fluoranteno (Flu)	18,5 \pm 3,9	26,6 \pm 3,6	26,5 \pm 3,7	121,0 \pm 21,4	26,2 \pm 3,4	146,6 \pm 30,7	28,1 \pm 7,1	38,8 \pm 9,5
Pireno (Pir)	25,1 \pm 4,2	136,0 \pm 29,1	17,7 \pm 2,3	106,1 \pm 21,0	87,2 \pm 16,9	43,7 \pm 9,4	21,7 \pm 4,9	60,0 \pm 15,1
Benzo(a)antraceno (BaA)	144,8 \pm 25,7	105,7 \pm 22,3	42,7 \pm 10,0	876,0 \pm 161,0	34,3 \pm 6,8	345,6 \pm 86,1	43,3 \pm 10,6	85,1 \pm 12,8
Criseno (Cris)	45,0 \pm 10,1	38,7 \pm 5,3	27,9 \pm 7,3	454,6 \pm 77,6	48,1 \pm 5,9	129,6 \pm 34,0	54,1 \pm 9,7	67,1 \pm 14,3
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	35,1 \pm 8,1	36,9 \pm 5,8	11,4 \pm 2,0	154,0 \pm 39,0	29,4 \pm 7,5	45,8 \pm 7,1	12,0 \pm 2,0	61,5 \pm 12,5
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	11,4 \pm 2,6	15,4 \pm 3,9	3,2 \pm 0,6	83,4 \pm 22,8	8,9 \pm 0,7	33,2 \pm 4,3	6,3 \pm 1,6	131,7 \pm 24,8
Benzo(a)pireno (BaP)	0,9 \pm 0,2	14,8 \pm 2,9	2,0 \pm 0,3	57,0 \pm 10,0	3,3 \pm 0,4	34,6 \pm 6,2	4,9 \pm 1,2	20,4 \pm 4,5
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	0,7 \pm 0,1	19,1 \pm 4,1	0,8 \pm 0,1	3,6 \pm 0,4	0,6 \pm 0,1	17,1 \pm 3,6	0,7 \pm 0,1	58,7 \pm 5,7
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	0,2 \pm 0,05	9,5 \pm 1,6	0,2 \pm 0,03	1,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,01	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,02	14,9 \pm 2,2
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	0,3 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,02	1,1 \pm 0,1	0,2*	0,1 \pm 0,02	0,1 \pm 0,0	8,0 \pm 1,7
TPAH	328 \pm 57	585 \pm 91	174 \pm 26	2094 \pm 290	282 \pm 61	883 \pm 166	238 \pm 38	814 \pm 123
PAHs principal (% do total)	BaA (44)	Pir (23)	BaA (25)	BaA (42)	Pir (31)	BaA (39)	Cris (23)	Acften (26)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado; n.d. – não detectado

entre o benzo(a)antraceno (BaA) e o criseno (Cris) nos 8 locais e nas 4 estações do ano. Os compostos entre o naftaleno (N) e o antraceno (Ant) assim como entre benzo(g,h,i)perileno (BPer) e o indeno(1,2,3, cd)pireno (IndP) são os compostos que apresentam as menores concentrações, nos locais e meses em estudo.

No que diz respeito ao Inverno I (Tab 4.1), o hidrocarboneto principal ao longo da costa é o benzo(a)antraceno (BaA), representando entre 26 e 41% do TPAH, em LG e VM, respectivamente. O criseno (Cris) foi o PAH principal nos mexilhões recolhidos em TV, representando 21% da concentração de TPAH. A concentração dos compostos de 2 e 3 anéis são baixas e da mesma ordem de grandeza, havendo um enriquecimento em acenafteno em todos os locais, sendo máximo em FR ($105,1 \pm 3,7$ ng/g ph). Neste grupo de PAHs (2 e 3 anéis), o fenantreno também apresenta um aumento da sua concentração relativamente aos outros compostos de 3 anéis, com concentrações máximas de $45,4 \pm 9,9$ ng/g ph (VM). Dos 4 compostos com 4 anéis de benzeno o BaA é dominante, com valores que oscilam entre $102,9 \pm 14,1$ (TV) e $2060,2 \pm 489$ ng/g ph (VM), seguido do criseno embora o fluoranteno também apresente níveis elevados, principalmente em VM ($1185,5 \pm 321,2$ ng/g ph) e OL ($357,2 \pm 27,4$ ng/g ph). Os PAHs de 5 e 6 anéis aromáticos, tal como os PAHs de 2 e 3 anéis, estão presentes em toda a costa em concentrações reduzidas, sendo o BbF e o BaP os mais importantes. De facto o BaP atinge a concentração máxima no Inverno I em OL ($337,4 \pm 85,2$ ng/g ph), seguido de VM ($115,1 \pm 30,5$ ng/g ph). A concentração de BPer é sempre superior à concentração de IndP em toda a costa, atingindo níveis superiores em VM e OL

As concentrações de TPAH decrescem do Inverno I para a Primavera (Tab. 4.2) em 6 locais, e aumentam em LG e PT que em conjunto com VM são os locais que registam TPAH superiores. TV tem a menor concentração de TPAH registada. Neste mês o criseno foi predominante em metade dos locais amostrados (entre 23 (SG) e 63% (PT) da concentração

TPAH), enquanto que o BaA representa entre 32 (TV) e 57% (VRSA). O naftaleno apresenta teores superiores em LG e PT, enquanto que dos compostos com 3 anéis aromáticos o acenafteno é o mais importante, com uma contribuição do acenaftileno em SG e VRSA. Segue-se o fenantreno com níveis superiores em LG ($51,2 \pm 7,1$ ng/g ph) e FR ($23,6 \pm 5,7$ ng/g ph), enquanto que o fluoreno e o antraceno são os PAHs com 3 anéis presentes em menores concentrações. O BaA e o Cris são os PAHs de 4 anéis predominantes variando os seus teores entre, respectivamente, $46,2 \pm 9,5$ (TV) e $533,5 \pm 115,8$ ng/g ph (LG) (BaA) e $21,5 \pm 1$ (TV) e $909,1 \pm 182,4$ ng/g ph (PT) (Cris). O fluoranteno em LG, PT, VM, OL e TV é mais importante que o pireno, apresentando este último concentrações superiores às de fluoranteno em SG, FR, e VRSA. O BbF é o PAHs de 5 anéis com teores mais elevados na maioria dos locais. O benzo(ghi)perileno, cujas concentrações são superiores às de IndP, atinge níveis mais elevados em LG ($18,8$ ng/g ph) e mínimos em TV ($0,5$ ng/g ph).

No Verão (Tab. 4.3), as concentrações dos 16 PAHs em 4 locais (SG, VM, OL e TV) são superiores às da Primavera precedente, cuja distribuição dos PAHs individuais é semelhante à dos meses anteriores, isto é, o acenafteno é o PAH de 3 anéis predominante, o BaA e o Cris tornam a ser os PAHs principais com concentrações que variam entre 20 e 40% do TPAH, com contributos importantes de fluoranteno e pireno. O BbF e o BkF são os mais importantes entre os PAHs de 5 anéis, com o BaP máximo em VRSA, onde a concentração de BPer é superior à de IndP.

De um modo geral as concentrações individuais dos PAHs estudados voltam a aumentar do Verão para o Outono (Tab. 4.4), particularmente em SG, PT, FR, OL e TV. PT é o local com níveis de TPAH mais elevados, essencialmente devido ao BaA ($720,3 \pm 140,7$ ng/g ph) e ao Cris ($417,5 \pm 96,5$ ng/g ph). Apresenta também um aumento de naftaleno, como em FR e TV. O acenafteno é dos PAHs com 3 anéis, o principal em todos os locais, com níveis entre

27,8±7,8 ng/g ph (TV) e 135± 13,4 ng/g ph (VRSA), onde este composto ocorreu em maiores concentrações que os restantes 15 PAHs, sendo cerca de 33% do TPAH. As concentrações dos restantes PAHs de 3 anéis oscilam entre 2,1±0,3 (LG - Ant) e 46,6±9,3 ng/g ph (PT – Acftil). Quanto aos compostos de 5 anéis aromáticos, os BbF e BkF predominam relativamente ao BaP e ao DahA, cujos níveis são superiores em VM, que por sua vez também regista um enriquecimento em DahA (54±11,7 ng/g ph). O mesmo aumento de DahA ocorreu em FR (25,4±4,1 ng/g ph).

No Inverno II, as concentrações dos PAHs são inferiores às do Outono e Inverno I precedentes. Assim, ao longo de um ano a costa Sul de Portugal apresenta uma contaminação por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos decrescente ao longo do tempo, com algumas exceções relativamente a alguns compostos e em alguns locais. O padrão de distribuição dos 16 PAHs ao longo da costa é idêntica à dos meses anteriores, ou seja, um predomínio de Acften nos PAHs de 3 anéis, de BaA e Cris nos de 4 anéis, de BbF e BkF nos PAHs de 5 anéis aromáticos e de BPer sobre IndP. No entanto verificam-se algumas particularidades, como sejam o pireno (4 anéis) aparece pela primeira vez como PAH principal em LG (136±29,2 ng/g ph) e FR (87,2±16,9 ng/g ph) com níveis de 23 e 32% respectivamente e o Acften (2 anéis) em VRSA (26%), onde as concentrações de BPer (14,9±2,2 ng/g ph) e IndP (8±1,7 ng/g ph) foram as mais elevadas nos mexilhões de toda a costa.

De modo a avaliar a distribuição espacial e temporal da concentração individual dos PAHs, foi aplicada a análise canónica de correspondência (CCA) à concentração PAHs individuais acumulados nos tecidos dos mexilhões, transformados em proporção do total. Como matriz secundária foi utilizada a proporção dos PAHs agrupados por número de anéis, ou seja 2+3 anéis, 4 anéis e 5+6 anéis. A Fig. 4.6 representa as correlações entre as concentrações

individuais de PAHs (variáveis) e a sua projecção nos eixos principais (*factor loadings*) enquanto que a Fig. 4.7 representa as coordenadas das observações (locais) nos eixos principais (*factor scores*), otimizando a diferença entre as variâncias dos compostos e locais, respectivamente. Os eixos principais 1 e 2 explicam 92,2% da variância.

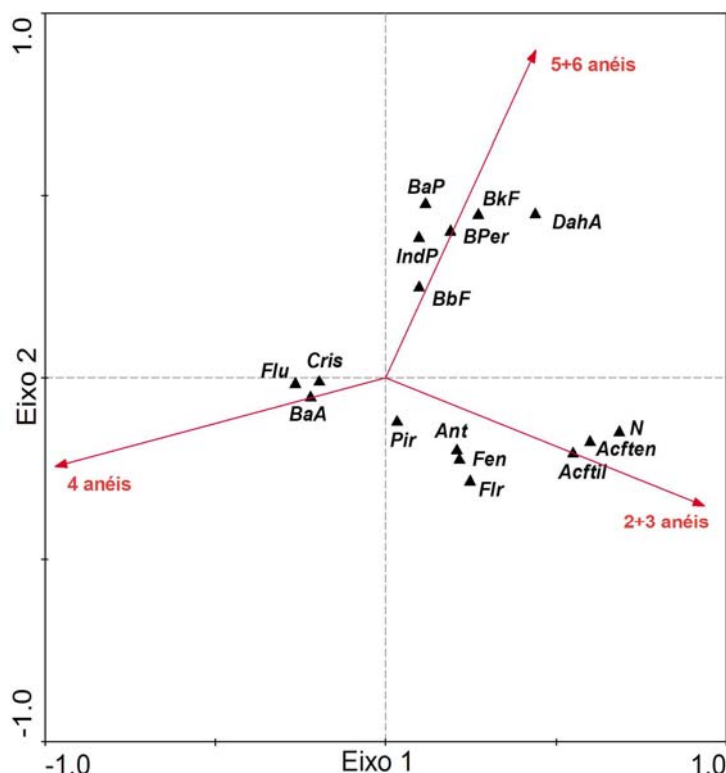


Figura 4.6 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração individual dos PAHs, nos mexilhões *M. galloprovincialis*, indicando os *loadings* no Eixo 1 e Eixo 2. (Abreviaturas dos PAHs indicadas na Tabela. 4.1 e seguintes)

Como se pode verificar (Fig. 4.6) os PAHs individuais acumulados pelos mexilhões distribuem-se agrupados por anéis, em que o eixo 1 separa os compostos de 2+3 e 5+6 anéis na zona positiva e os de 4 anéis na zona negativa, tal como também evidenciado pelos vectores, que têm comportamento inverso, ou seja à medida que a concentração de PAHs de 4 anéis aumenta, a concentração de PAHs com 2+3 e 5+6 diminui. O mesmo efeito foi

observado na Fig. 4.3. Os compostos fluoranteno, benzo(a)antraceno e criseno são os PAHs de 4 anéis cuja distribuição da concentração é semelhante entre si e diferente da distribuição do pireno, também de 4 anéis, que aparece na zona positiva do eixo 1, junto à origem, e agrupado com compostos de 3 anéis, indicando que a concentração de pireno é relativamente semelhante à de compostos como o antraceno, fenantreno ou fluoreno. De facto, o BaA é o composto que predomina na maioria dos casos, seguido do criseno (Tab. 4.1 a 4.5) enquanto que o pireno tem concentrações inferiores. Por outro lado, o eixo 2 separa os compostos de 2 (naftaleno) e 3 anéis (acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno e antraceno) na zona negativa, e os compostos de 5 e 6 anéis na zona positiva, sugerindo um comportamento oposto entre si. O vector 2+3 está relacionado com o eixo 1, tal como o vector de 4 anéis, enquanto que o vector 5+6 está relacionado com o eixo 2, separando também os compostos por peso molecular. Assim, verifica-se que os compostos de 4 anéis se correlacionam inversamente com os restantes, e que os compostos de 2 e 3 anéis apresentam uma variação inversa à dos compostos de 5 e de 6 anéis.

No que diz respeito à variação sazonal e espacial das concentrações individuais de PAHs determinadas nos tecidos de *M. galloprovincialis* (Fig. 4.7 - cores) verifica-se que a maioria dos locais no Inverno I e Outono estão agrupados, relativamente às restantes estações do ano, com algumas diferenças espaciais. De facto, quando se representam os *scores* por locais (Fig. 4.7 - números), o eixo 1 separa SG, VM, OL e em menor grau LG e PT, na zona negativa e os locais FR, TV e VRSA na zona positiva, indicando diferentes tipos de contaminação entre os locais, onde no primeiro predominam os PAHs de 4 anéis e 5+6 anéis, indicadores de PAHs pirolíticos, e no segundo há um aumento de compostos de 2+3 anéis e um decréscimo de PAHs de 4 anéis, indicando prováveis fontes petrogénicas.

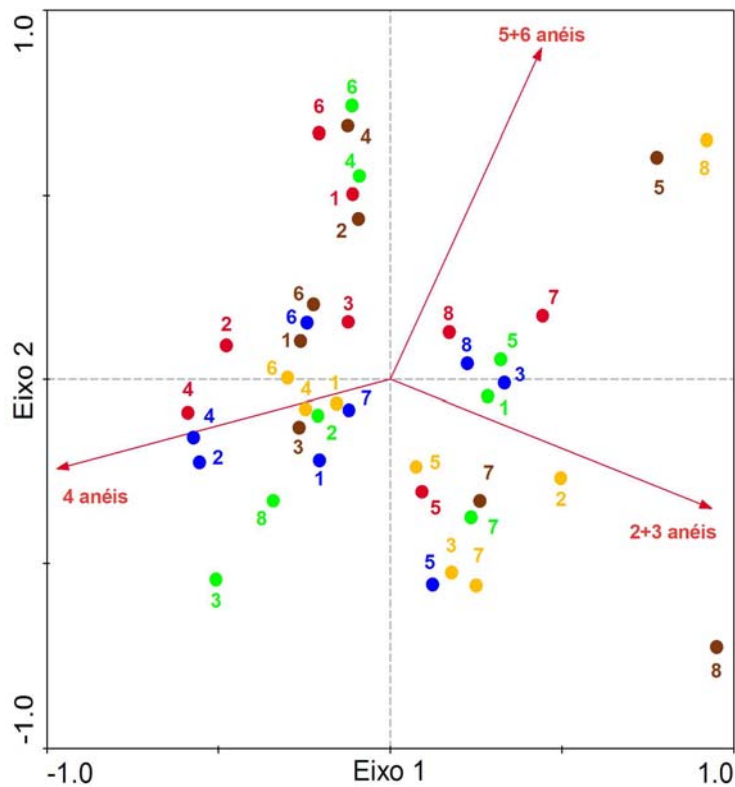


Figura 4.7 - Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração de PAHs, nos mexilhões *M. galloprovincialis*, indicando os *scores* legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

O eixo 2, com o qual se correlaciona o vector 5+6 anéis, separa os locais que apresentam concentrações superiores de PAHs de elevado peso molecular como VM na Primavera e Outono e OL no Inverno I e Primavera, tal como verificado na Fig. 4.3. Nestes locais, as concentrações de BbF, BaP, BPer e IndP são superiores às encontradas nos restantes locais (Tab. 4.1 a 4.5). Em FR, TV e VRSA as concentrações de PAHs de 2+3 anéis são superiores, nomeadamente em naftaleno e/ou acenafteno, cuja concentração foi máxima em VRSA no Outono em detrimento dos compostos de 5+6 anéis, fazendo com que a sua projecção se localize no canto inferior direito. Porém nestes locais também se faz sentir a influência de PAHs de 4 anéis como em VRSA na Primavera ou TV no Verão, cujas projecções se

localizam na zona negativa do eixo 1, assim como os PAHs de 5 e 6 anéis, que no Outono (FR) e Inverno II (VRSA) se localizam na zona positiva do eixo 2 (Fig. 4.6 e 4.7).

Várias razões entre isómeros de PAHs foram aplicadas como indicadores de diagnóstico para identificar as principais fontes de PAHs encontradas nos mexilhões, cujos valores recolhidos na bibliografia são apresentados na Tabela 4.6. Os resultados obtidos para os mexilhões da costa Sul de Portugal encontram-se na Tabela A1 (Anexo), enquanto que nas Figuras 4.8 e 4.9 se mostra a sua representação gráfica.

Tabela 4.6 - Razões de diagnóstico para diferentes fontes de PAHs.

	Pirolítica	Petrogénica		
Fen/Ant ^a	< 10	> 10		
Flu/Pir ^a	>1	<1		
	Ant/Ant+Fen^b	Flu/Flu+Pir^b	BaA/BaA+Cris^b	IndP/IndP+BPer^b
Petróleo	<0,10	<0,40	<0,20	<0,20
Combustão do petróleo		0,40– 0,50		0,20- 0,50
Petróleo e combustão (mista)			0,20 – 0,35	
Combustão			>0,35	
Combustão de biomassa e carvão	>0,10	>0,50		>0,50

a – Mille *et al.*, 2007; b –Yuker *et al.*, 2002b, Oros e Ross 2005, Oros *et al.*, 2006

Durante o período anual, a razão Fen/Ant (0,6 - 16,68) foi menor que 10 na maioria dos casos e maior que 10 somente em 5 casos, indicando origem de PAHs essencialmente pirolítica. Do mesmo modo a razão Flu/Pir, cujos valores oscilam entre 0,11 e 3,83, também indica fontes pirolíticas de PAHs, embora esta tendência não seja tão acentuada como na razão Fen/Ant. Assim, quando se graficam os resultados das razões Fen/Ant vs Flu/Pir (Fig. 4.8), verifica-se que a principal origem dos PAHs nos mexilhões apresenta, durante a maior parte do ano, características pirolíticas, nomeadamente em VM e OL (em todas as estações), PT (em 4 das

5 estações), LG (no Inverno I e na Primavera), SG (no Verão) (Flu/Pir >1 e Fen/Ant <10). Nestes locais existem portos de pesca ou marinas, nos quais o tráfego marítimo é relativamente intenso. Por outro lado, FR (no Inverno I, Primavera e Verão) e VRSA (na Primavera) apresentam PAHs de origem petrogénica (Flu/Pir <1 e Fen/Ant >10). Fontes mistas de PAHs surgem quando uma das razões diagnóstico indica PAHs de origem pirolítica e a outra de origem petrogénica.

O Inverno I, o Outono e o Inverno II são os meses onde as contribuições mistas são mais evidentes, essencialmente devido à razão Flu/Pir < 1, principalmente em SG, FR, TV e VRSA, enquanto que na Primavera somente SG apresentou origens mistas de PAHs. No Verão as contribuições mistas de PAHs surgem em TV e VRSA.

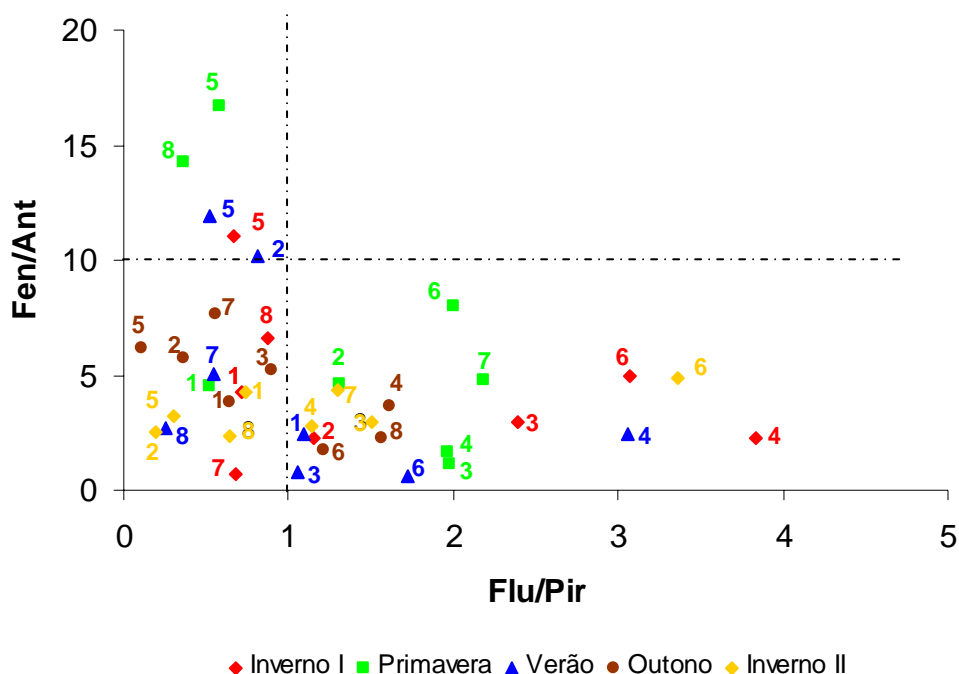


Figura 4.8 - Representação gráfica da razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir), durante o período anual. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

Para melhor distinguir a origem dos PAHs nos tecidos dos mexilhões, foram calculadas outras razões de isômeros que distinguem entre PAHs pirolíticos com origem na combustão incompleta de combustíveis fósseis dos PAHs com origem na combustão da biomassa. Tais razões são: Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris; IndP/IndP+BPer e Flu/Flu+Pir (Tabela 4.6). Os resultados (Fig.4.9; Tab. A1, Anexo) obtidos para a razão de diagnóstico Ant/Ant+Fen indicam que a origem dos PAHs nos mexilhões derivam principalmente da combustão, surgindo apenas 5 locais onde a origem dos PAHs é dos derivados do petróleo (LG no Verão, FR no Inverno I, Primavera e Verão, e VRSA na Primavera). Estes resultados estão em conformidade com o observado na razão Fen/Ant, que também revelou predominância de PAHs pirolíticos. O antraceno e o fenantreno são PAHs voláteis de 3 anéis formados principalmente nos processos de combustão, sendo a sua principal via de entrada no ambiente marinho a deposição atmosférica (Oros e Ross, 2005). A maioria dos locais apresenta valores da razão Flu/Flu+Pir consistente com PAHs emitidos pela combustão incompleta de combustíveis fósseis ou uma mistura de PAHs provenientes da combustão de madeira (ou possivelmente do seu tratamento com creosote) e/ou carvão, com ocorrências menores de petróleo (ou combustíveis) não queimado. A razão Ant/Ant+Fen >0,10 corresponde na maioria dos casos a valores da razão Flu/Flu+Pir >0,40 suportando a conclusão de que os produtos pirolíticos são uma forte componente das amostras mais contaminadas. A mesma tendência é verificada pelos resultados da razão BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer, com PAHs resultantes primariamente da combustão e da combustão de produtos do petróleo, e em muito menor grau de fontes mistas ou da combustão de madeiras e ou de petróleo não queimado.

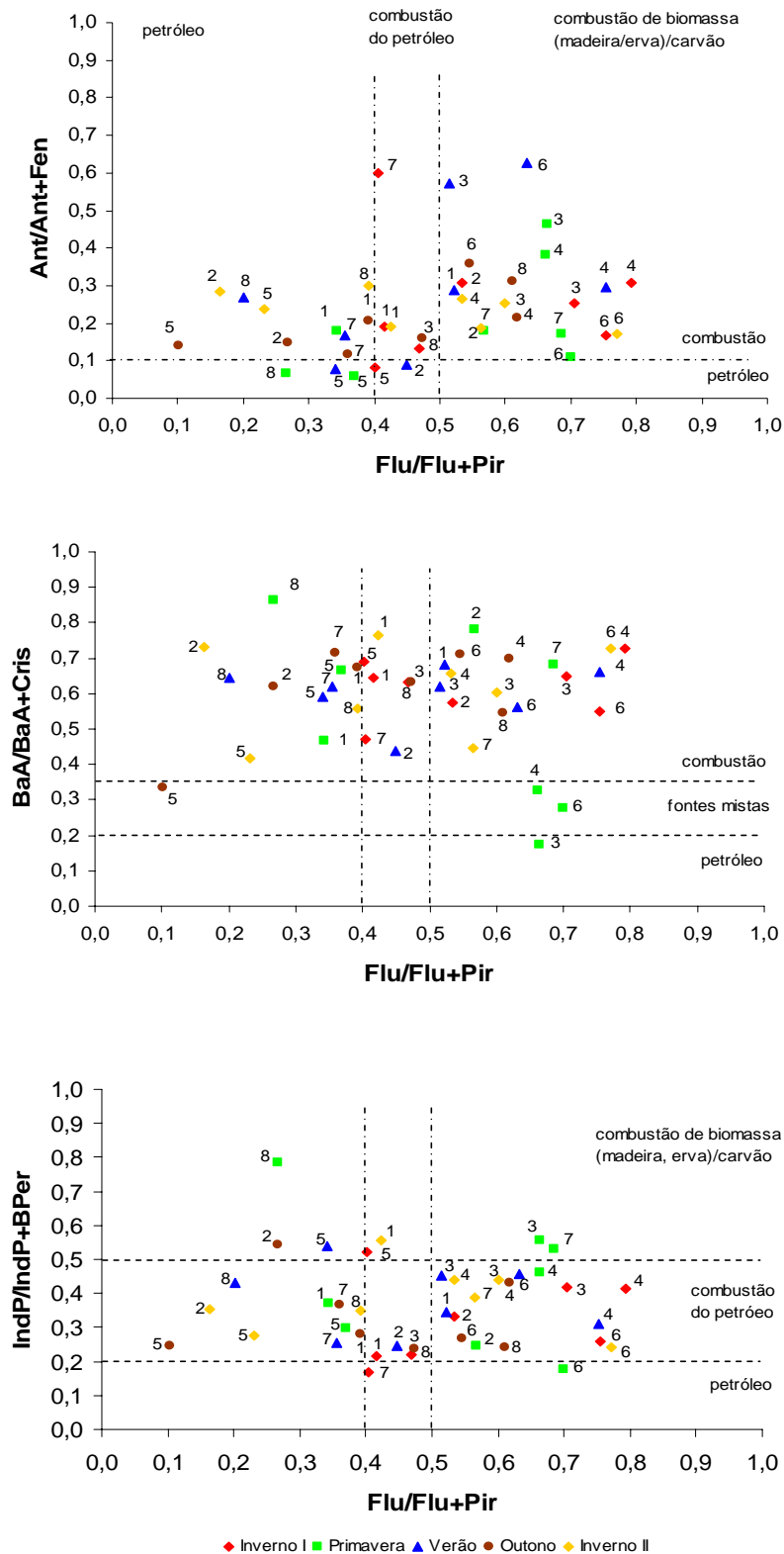


Figura 4.9 – Representação gráfica das razões $Ant/Ant+Fen$; $BaA/BaA+Cris$ e $IndP/IndP+BPer$ em relação à razão $Flu/Flu+Pir$, calculadas para os mexilhões *M. galloprovincialis*, da costa Sul de Portugal. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - VRSA).

Dados os diferentes perfis moleculares para madeira/erva e gasolina/diesel/carvão, é provável que a combustão de madeira tenha maior influência na razão Flu/Flu+Pir enquanto que a combustão de combustíveis fósseis (emissões de veículos e barcos) tem mais influência nas razões BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer. Assim, ao longo da costa Sul de Portugal, os PAHs encontrados nos tecidos dos mexilhões parecem indicar tanto origens petrogénicas como pirolíticas, sendo estas principalmente originadas pela combustão de produtos do petróleo e/ou biomassa (madeira, erva, carvão).

Outra forma de clarificar a origem dos PAHs nos mexilhões da costa Sul de Portugal é comparar a sua distribuição com perfis ou assinaturas características, através da análise multivariada PLS. Dado a escassez de trabalhos relativos a concentrações individuais de PAHs na costa Sul de Portugal, várias assinaturas recolhidas na literatura foram aplicadas para desenvolver o X-Block no PLS (Mediterrâneo, Alasca, Atlântico norte, zonas urbanas). Embora estas assinaturas possam não estar directamente relacionadas com a origem de PAHs na costa Sul de Portugal, são indicativas de diferentes fontes de PAHs. Foram utilizadas 22 assinaturas, desde petróleo com vários graus de degradação, diesel, creosoto, carvão, combustão da madeira, até níveis basais de PAHs encontrados em diversos locais, entre outros. Na Tabela A2 (Anexo) estão representadas as diferentes concentrações dos PAHs individuais nas diferentes assinaturas. Deste modo, um conjunto relativamente grande de assinaturas e fontes foi obtido, assegurando uma melhor avaliação da origem dos PAHs nos mexilhões da costa Sul de Portugal. Cada assinatura (X-Block) foi ajustada aos dados de PAHs dos mexilhões (Y – Block) recolhidos em todos os locais e estações do ano. A variância explicada pelas assinaturas mais representativas das diferentes origens é apresentada na Fig. 4.10.

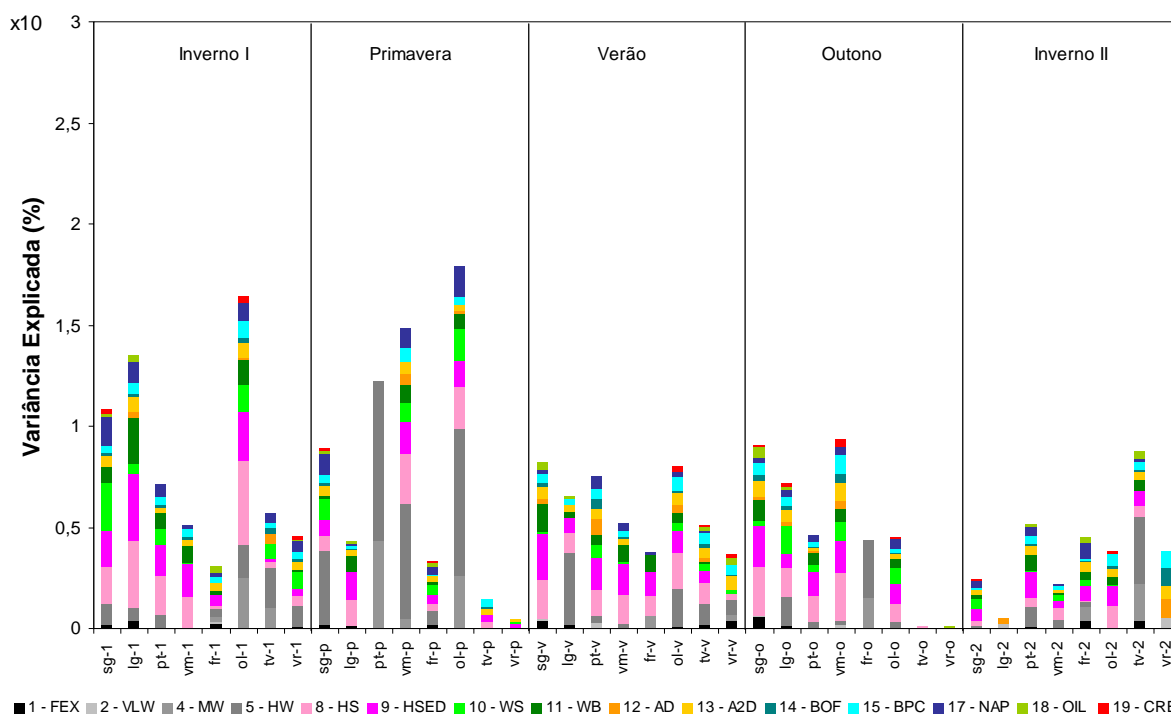


Figura 4.10 - Análise PLS das assinaturas de PAHs aplicada aos tecidos moles de *M. galloprovincialis* (Abreviaturas das assinaturas como na Tabela A2, Anexo).

Em alguns locais menos de 10% da variância total dos dados de mexilhões é explicada, pelo que as assinaturas utilizadas não foram suficientes para explicar a origem dos PAHs. Talvez se deva a que as assinaturas não sejam correctas para esses locais ou também devido à metabolização dos compostos por parte dos mexilhões, que pode alterar as concentrações dos PAHs parentais. Na maioria do locais mais de 100% de variância explicam os resultados, devido a sobreposição de assinaturas. Os PAHs encontrados em locais como FR, TV ou VRSA são pouco ou nada explicados pelas assinaturas utilizadas enquanto que na maioria dos locais a variância explica entre 20% a 100% das concentrações de PAHs. Nestes casos as principais fontes de PAHs provêm das assinaturas 1 a 11. As assinaturas 1 a 7 são assinaturas de petróleo originais não combustado com vários graus de degradação, desde derrames recentes até extremamente degradado. Este tipo de assinaturas estão presentes nos mexilhões

de quase toda a costa Sul de Portugal, apresentando variâncias elevadas em PT e OL na Primavera e FR no Outono, sendo as únicas assinaturas relevantes no primeiro e último caso. Indicam a presença de PAHs ambientalmente degradados resultantes das actividades náuticas ou portuárias. A assinatura 8 refere-se a PAHs pirolíticos resultantes das actividades domésticas, e está também presente na maioria dos locais. A assinatura 9, característica de sedimentos de portos, apresenta elevadas proporções de PAHs de 4, 5 e 6 anéis, e muito pouco de PAHs de 2 e 3 anéis, indicando PAHs pirolíticos derivados da combustão de combustíveis fósseis. É indicadora do tráfego marítimo costeiro e actividades portuárias. As assinaturas 10 e 11 compreendem PAHs provenientes da combustão da madeira, quer nas cinzas (WS) como na fase gasosa (WB), e ambas são ricas em PAHs de 4, 5 e 6 anéis. A sua presença nos mexilhões da costa Sul de Portugal pode estar associada a fogos florestais assim como ao aquecimento doméstico. As assinaturas 12 e 13 são provenientes de dois tipos de gasóleo originais (“Alaskan diesel” e “A2 diesel fuel”), com elevada proporção de naftaleno e fenantreno e baixa proporção de compostos de 5 e 6 anéis. Pode estar relacionada tanto com o tráfego marítimo como pelas escorrências das estradas, uma vez que parte do combustível é emitido pelos escapes sem ter sofrido pirólise (Abrantes *et al.*, 2004), encontrando-se presente em todos os locais, sendo a variância explicada superior em VRSA no Inverno II. As assinaturas 14 e 15 correspondem a PAHs encontrados em sedimentos recolhidos *offshore* (100 a 1000 m da costa), caracterizados pelo domínio de PAHs de baixo peso molecular (2 e 3 anéis). A sua presença nos mexilhões da costa Sul de Portugal poderá estar relacionada com a ressuspensão dos sedimentos. A assinatura 17 é constituída por PAHs encontrados na fracção particulada de amostras de água do Atlântico Norte, com domínio de benzofluorantenos, e é referida pelos autores como PAHs encontrados nas correntes superficiais que entram no Mediterrâneo (Lipiatou *et al.*, 1997). Esta assinatura foi detectada

na maioria das amostras de mexilhões da costa Sul de Portugal. As assinaturas 18 (média de PAHs analisados em 60 amostras de crude (Kerr *et al*, 1999) e 19 (creosoto, um conservante da madeira) são as que explicam menor variância dos dados de PAHs, ocorrendo no entanto em alguns locais ao longo do ano. O creosoto é usado como conservante da madeira e embora tenha sido banido em 1999 (DL 446/99), o seu uso em embarcações, estaleiros, instalações portuárias e fluviais poderá explicar a sua presença ocasional na costa Sul de Portugal.

A análise PLS indica que é possível ter uma indicação da origem de PAHs nos mexilhões da zona costeira sendo essas atribuíveis a compostos pirolíticos, maioritariamente constituídos por PAHs de 4, 5 e 6 anéis, originados quer pela combustão da biomassa quer da combustão de combustíveis fósseis, que chegam ao meio marinho por deposição atmosférica, escorrências urbanas e tráfego marítimo costeiro. A análise PLS indica também a presença de PAHs petrogénicos com origem em petróleo/crude e/ou produtos refinados puros (gasolina, gasóleo, outros), que podem decorrer das actividades portuárias como pequenos derrames durante o abastecimento de combustível aos barcos, ou durante as transfegas comerciais para os depósitos locais.

4.3.2 – Distribuição Temporal

O estudo temporal refere-se a amostras recolhidas em 2 situações de Inverno consecutivas (Inverno I – Fevereiro de 1996) e Inverno II (Fevereiro de 1997), e outra situação de Inverno em 2003 a que se chamou Inverno III. No estudo temporal pretende-se avaliar o efeito da contaminação por PAHs ao longo do tempo, na costa Sul de Portugal

A - PAHs Totais

Relativamente à concentração total de PAHs ($\Sigma 16$ PAHs) durante o estudo temporal, (Fig. 4.11), verifica-se que as concentrações nos mexilhões ao longo da costa Sul de Portugal decrescem significativamente em 6 anos. Vilamoura apresenta o decréscimo mais acentuado, cujas concentrações de PAHs diminuíram 82% do Inverno I para o Inverno III, e Olhão, que registou um decréscimo de 62%. Nos restantes locais também se observa uma diminuição da contaminação ao longo do tempo, mas esse decréscimo é menos acentuado e semelhante. De facto, as concentrações de PAHs diminuem do Inverno I para o Inverno II em todos os locais excepto VRSA onde houve um aumento dos teores de PAHs nos mexilhões, mas do Inverno II para o Inverno III as concentrações de PAHs mantêm-se (excepto VM) ou aumentam como em PT, FR e TV.

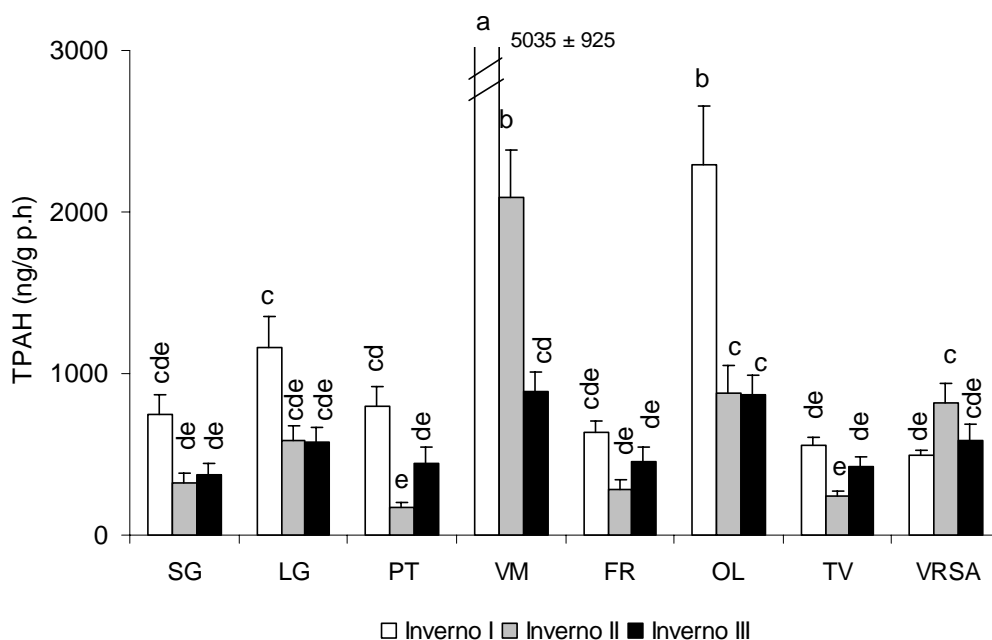


Figura 4.11- Concentração total de PAHs (ng/g ph) em mexilhões *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal.

No que diz respeito à distribuição da concentração dos PAHs por anéis aromáticos (Fig. 4.12), verifica-se, tal como para a variação espacial e sazonal, um predomínio dos compostos com 4 anéis, embora as concentrações tenham, tal como para os PAHs totais vindo a diminuir do Inverno I para o III, aumentando a proporção dos compostos com 2+3 anéis (petrogénicos) particularmente em TV (54%) e 5+6 anéis (pirolíticos) em FR (51%). De um modo geral a fonte principal dos PAHs é pirolítica, formada por compostos de 4, 5 e 6 anéis, com contributo importante de PAHs petrogénicos. Enquanto que as concentrações de PAHs de 4 anéis diminuem cerca de 20% do Inverno I para o Inverno III, verifica-se um enriquecimento de PAHs de 5 e 6 anéis e de 2+3 anéis.

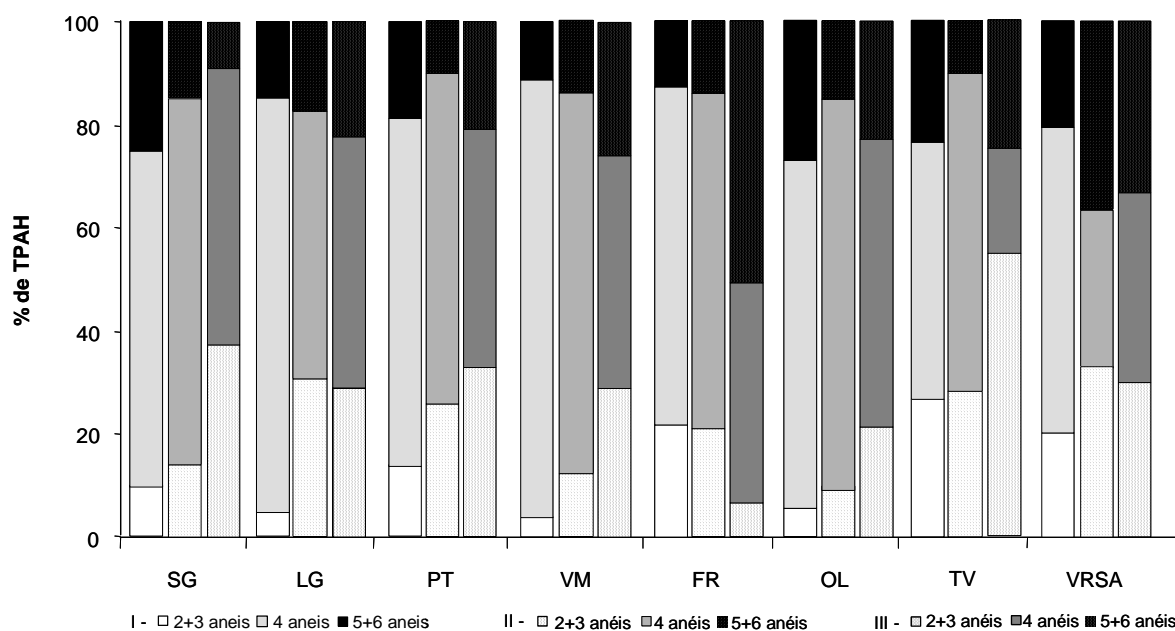


Figura 4.12 - Distribuição de PAHs agrupados por número de anéis aromáticos, nos tecidos de *M. galloprovincialis*, ao longo da costa Sul de Portugal, durante o estudo temporal.

B - PAHs Individuais

Quanto à distribuição temporal dos PAHs individuais estudados, podemos verificar pelas Tabelas 4.1, 4.5 e 4.7, que o Inverno III é dos três Invernos o que apresenta menores concentrações totais de PAHs e um perfil de distribuição diferente do dos Invernos precedentes. De facto, ao longo do tempo os compostos de 4 anéis são predominantes essencialmente devido ao Flu, BaA e Cris, cujas concentrações são máximas no Inverno I em VM, OL, LG e PT, decrescendo para o Inverno II onde os locais com níveis máximos foram novamente VM e OL. Durante o período temporal o Acften foi o PAHs de 3 anéis que de um modo geral predomina, atingindo níveis máximos em VRSA (Inverno II) e em VM (Inverno III). Em TV no Inverno III a concentração de Acften contribuiu com 15% do TPAH, que em conjunto com os outros PAHs de 3 anéis e o naftaleno, perfizeram 54% do TPAH. Dos PAHs com 5 anéis aromáticos o BbF é o mais significativo, com teores máximos em VM (Inverno I e II), em OL (Inverno I) e em LG (Inverno III). O BaP apresenta um máximo no Inverno I em OL, enquanto nos restantes locais e meses os níveis são semelhantes e inferiores. O PAH de 6 anéis aromáticos predominante nos mexilhões em toda a costa e durante os três Invernos é o BPer, que em conjunto com os PAHs de 5 anéis perfazem uma percentagem que atinge o máximo em FR no Inverno III (51%).

De modo a melhor avaliar a distribuição espacial e temporal das concentrações individuais dos PAHs acumulados nos tecidos dos mexilhões, foi aplicada a análise CCA aos dados transformados em proporção da concentração total. Para a análise foram utilizados os dados das concentrações individuais de PAHs determinados nas três situações de Inverno. A Figura 4.13 representa o diagrama dos *loadings* (Fig. 4.13 A) e dos *scores* (Fig. 4.13 B) resultante da análise, em que o eixo 1 e o 2 explicam 95% da variância.

Tabela 4.7 - Concentração individual dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (média ± dp) (ng/g ph), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal no **Inverno III**.

	Sagres	Lagos	Portimão	Vilamoura	Faro	Olhão	Tavira	VRSA
INVERNO III								
Naftaleno (N)	9,6 ± 1,3	1,3 ± 0,3	10,8 ± 1,1	15,4 ± 3,5	0,1 ± 0,01	27,2 ± 5,5	57,3 ± 9,6	17,7 ± 3,7
Acenaftileno (Acftil)	2,8 ± 0,7	28,3 ± 3,2	13,1 ± 2,4	46,5 ± 7,2	7,4 ± 1,8	38,6 ± 9,9	29,9 ± 6,9	27,3 ± 4,4
Acenafteno (Acften)	48,9 ± 8,9	32,6 ± 4,4	7,7 ± 1,6	89,6 ± 14,8	7,9 ± 1,5	42,1 ± 7,8	63,2 ± 12,8	26,6 ± 4,4
Fluoreno (Flr)	29,4 ± 4,4	17,6 ± 4,6	21,8 ± 3,9	56,5 ± 12,0	4,5 ± 0,9	39,7 ± 6,0	48,8 ± 7,0	67,0 ± 6,9
Fenantreno (Fen)	31,4 ± 7,4	44,7 ± 7,4	41,7 ± 5,8	28,3 ± 4,0	6,3 ± 1,2	22,3 ± 4,1	21,1 ± 2,4	34,5 ± 6,0
Antraceno (Ant)	16,8 ± 1,7	42,6 ± 10,6	56,5 ± 13,3	17,6 ± 4,0	2,8 ± 0,3	15,4 ± 3,2	12,6 ± 3,3	2,9 ± 0,6
Fluoranteno (Flu)	23,4 ± 5,9	56,2 ± 12,5	63,5 ± 11,8	153,5 ± 27,9	45,7 ± 6,3	87,1 ± 12,8	21,7 ± 3,3	38,4 ± 7,3
Pireno (Pir)	53,5 ± 11,8	76,8 ± 11,7	40,7 ± 7,7	80,4 ± 14,3	61,6 ± 11,3	52,6 ± 10,5	11,8 ± 2,5	65,3 ± 14,4
Benzo(a)antraceno (BaA)	71,5 ± 15,3	79,5 ± 15,6	54,4 ± 10,0	124,0 ± 14,9	56,3 ± 12,8	220,1 ± 22,6	20,6 ± 5,3	39,7 ± 5,6
Criseno (Cris)	52,5 ± 10,9	65,6 ± 13,4	52,2 ± 8,8	44,4 ± 7,9	32,4 ± 7,4	129,2 ± 17,5	34,3 ± 8,8	72,7 ± 15,8
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	19,0 ± 3,0	88,4 ± 16,4	63,2 ± 9,1	74,3 ± 1,0	41,6 ± 9,6	59,3 ± 3,2	63,2 ± 8,8	65,7 ± 11,4
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	2,9 ± 0,6	12,2 ± 1,9	20,8*	70,9 ± 16,5	60,5 ± 10,8	54,5 ± 8,5	17,6 ± 3,7	57,1 ± 5,9
Benzo(a)pireno (BaP)	6,9 ± 1,3	21,2 ± 3,3	4,4*	22,2 ± 4,9	48,6 ± 10,3	22,7 ± 5,9	16,6 ± 3,4	50,2 ± 7,3
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	3,7 ± 0,9	1,3 ± 0,2	6,0*	21,5 ± 2,2	32,0 ± 8,6	22,3 ± 4,0	4,9 ± 1,0	17,2 ± 2,9
Benzo(g,h,i)perileno (BPer)	0,7 ± 0,1	4,5 ± 0,9	1,0*	25,1 ± 4,6	28,1 ± 2,9	24,5 ± 5,7	3,1 ± 0,5	4,7 ± 0,6
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,9*	16,4 ± 1,8	22,4 ± 4,5	14,2 ± 1,1	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1
TPAH	374 ± 69	574 ± 91	442 ± 99	887 ± 122	458 ± 90	872 ± 115	427 ± 62	589 ± 97
PAHs principal (% do total)	BaA (19)	BbF (15)	Flu (14)	Flu (17)	Pir (14)	BaA (25)	Acften (15) BbF (15)	Cris (12)

TPAH: soma da concentração individual dos 16 PAHs; *: somente num dos replicados este hidrocarboneto aromático foi identificado

Tal como ocorrido durante o período anual (Figura 4.6), os PAHs individuais nos tecidos dos mexilhões no estudo temporal (Fig. 4.13) distribuem-se por grupo de anéis aromáticos, assinalados por vectores. O eixo 1 separa os compostos de 4 anéis na zona negativa e os restantes na zona positiva, enquanto que o eixo 2 separa os PAHs de 2 e 3 anéis na zona negativa e os PAHs de 5 e 6 anéis na zona positiva, sugerindo um comportamento inverso entre si. O vector 2+3 está relacionado com o eixo 1, tal como o vector de 4 anéis, enquanto que o vector 5+6 está relacionado com o eixo 2, separando também os compostos por peso molecular. Assim, verifica-se que os compostos de 4 anéis se correlacionam inversamente com os restantes, e que os compostos de 2 e 3 anéis apresentam uma variação da concentração inversa à concentração dos compostos de 5 e de 6 anéis.

O arranjo das variáveis resulta num diagrama de *scores* (Fig. 4.13 B) que separa as amostras dos Invernos I e II das do Inverno III, ao longo do eixo 1. Relativamente aos Invernos I e II, o Inverno III apresenta menores concentrações de PAHs com 4 anéis e maiores proporções de PAHs com 2+3 e 5+6 anéis, com particular destaque para FR, onde a concentração de PAHs com 5 anéis corresponde a 40% da concentração total e os PAHs de 6 anéis a 11%, com aumento significativo de BkF, BPer e IndP. Por oposição SG e TV (Inverno III) são os locais com maior proporção de PAHs de 2+3 anéis, devido essencialmente ao Acften (SG e TV) e ao naftaleno (TV).

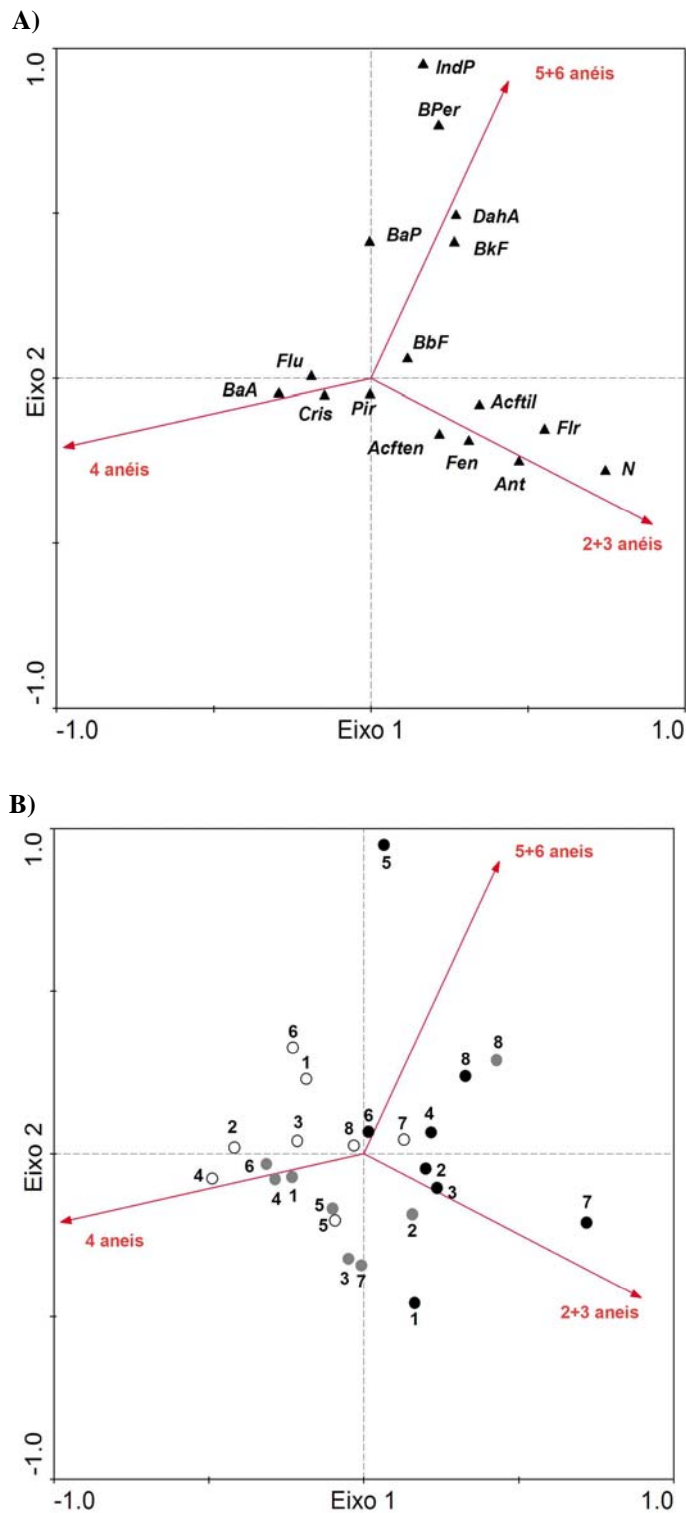


Figura 4.13 – Análise canónica de correspondência (CCA) da concentração de PAHs, nos mexilhões *M. galloprovincialis*, indicando os *loadings* (A), e os *scores* (B). (o-: Inverno I; ●-: Inverno II; ● : Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

De modo a avaliar a origem dos PAHs nos tecidos dos mexilhões no estudo temporal, foram calculadas várias razões diagnósticas, tal como efectuado no estudo anual, cujos resultados se apresentam na Tabela A1 (Anexo) e Figuras 4.14 e 4.15. Comparativamente ao Inverno I e II, e no que diz respeito à razão Fen/Ant (0,74 – 11,98), no Inverno III somente VRSA apresenta PAHs com características petrogénicas (Fen/Ant >10), enquanto que a razão Flu/Pir indica a presença de PAHs com características tanto petrogénicas (Flu/Pir <1) como pirolíticas (Flu/Pir >1), tal como sucedeu no estudo anual. Assim, quando se graficam os resultados obtidos para as razões diagnósticas Fen/Ant vs Flu/Pir (Fig. 4.14), verifica-se que ao longo do estudo temporal PT, VM e OL apresentam PAHs com características pirolíticas nos três Invernos, enquanto que locais como SG, LG, FR, TV e VRSA têm perfis mistos, ou seja, apresentam PAHs tanto petrogénicos como pirolíticos.

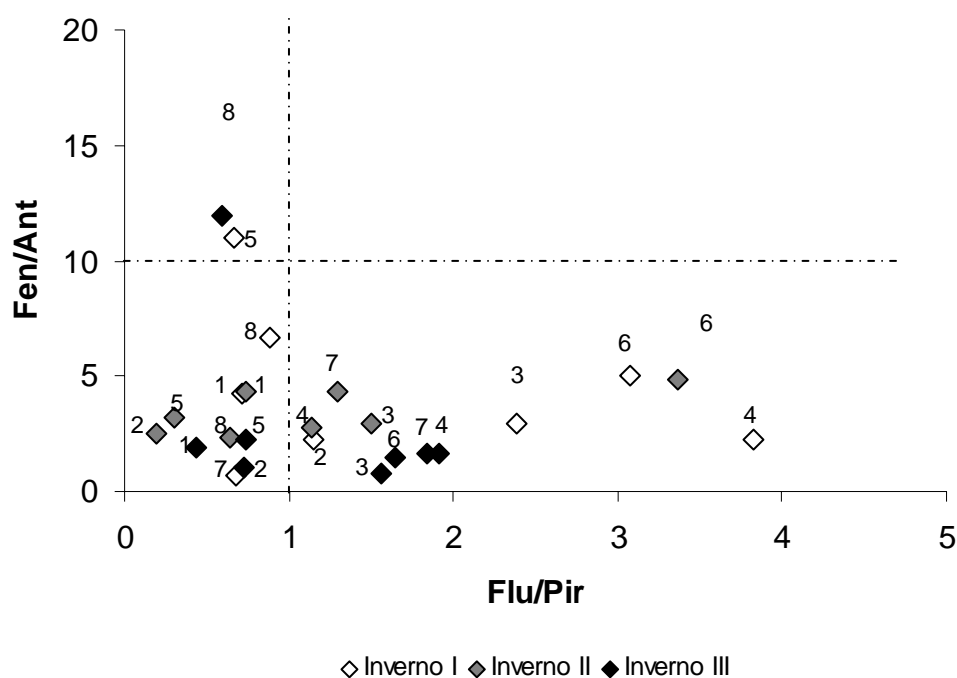


Figura 4.14 - Razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir), durante o estudo temporal.

Embora no Inverno III, TV apresente concentrações elevadas de naftaleno (petrogénico) e FR apresente concentrações elevadas de compostos essencialmente pirolíticos (4, 5 e 6 anéis) as razões de diagnóstico Fen/Ant e Flu/Pir indicam no primeiro caso fontes pirolíticas de PAHs e no segundo caso fontes mistas.

Relativamente às razões entre isómeros Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris; IndP/IndP+BPer e Flu/Flu+Pir (Fig.4.15; Tabela A1, Anexo), também calculadas para os dados do Inverno III com o objectivo de melhor clarificar as origens dos PAHs nos mexilhões da costa Sul de Portugal, verifica-se que, para a razão Ant/Ant+Fen somente VRSA apresenta PAHs petrogénicos derivados do petróleo (Ant/Ant+Fen <0,1), enquanto que nos restantes locais do Inverno III os PAHs terão possivelmente origem em processos de combustão (Ant/Ant+Fen >0,1). A razão Flu/Flu+Pir, que distingue entre PAHs petrogénicos derivados do petróleo (ou seus derivados) (Flu/Flu+Pir <0,4), dos PAHs pirolíticos derivados da combustão do petróleo (ou seus derivados) (Flu/Flu+Pir entre 0,4 e 0,5) ou da combustão de biomassa (Flu/Flu+Pir >0,5) indica que no Inverno III, tal como ocorrido nos Invernos precedentes, a principal origem dos PAHs nos mexilhões é pirolítica, quer originada na combustão dos combustíveis fósseis como das madeiras, embora SG e VRSA apresentem PAHs derivados do petróleo não queimado. A razão BaA/BaA+Cris indica que não houve alteração do tipo de contaminação durante o estudo temporal, ou seja, todos os locais durante os três Invernos apresentam PAHs pirolíticos originados pela combustão (BaA/BaA+Cris>0,35). Do mesmo modo, a razão IndP/IndP+BPer também indica PAHs pirolíticos derivados da combustão de produtos petrolíferos (gasóleo, gasolina) na maioria dos locais (IndP/IndP+BPer entre 0,2 e 0,4).

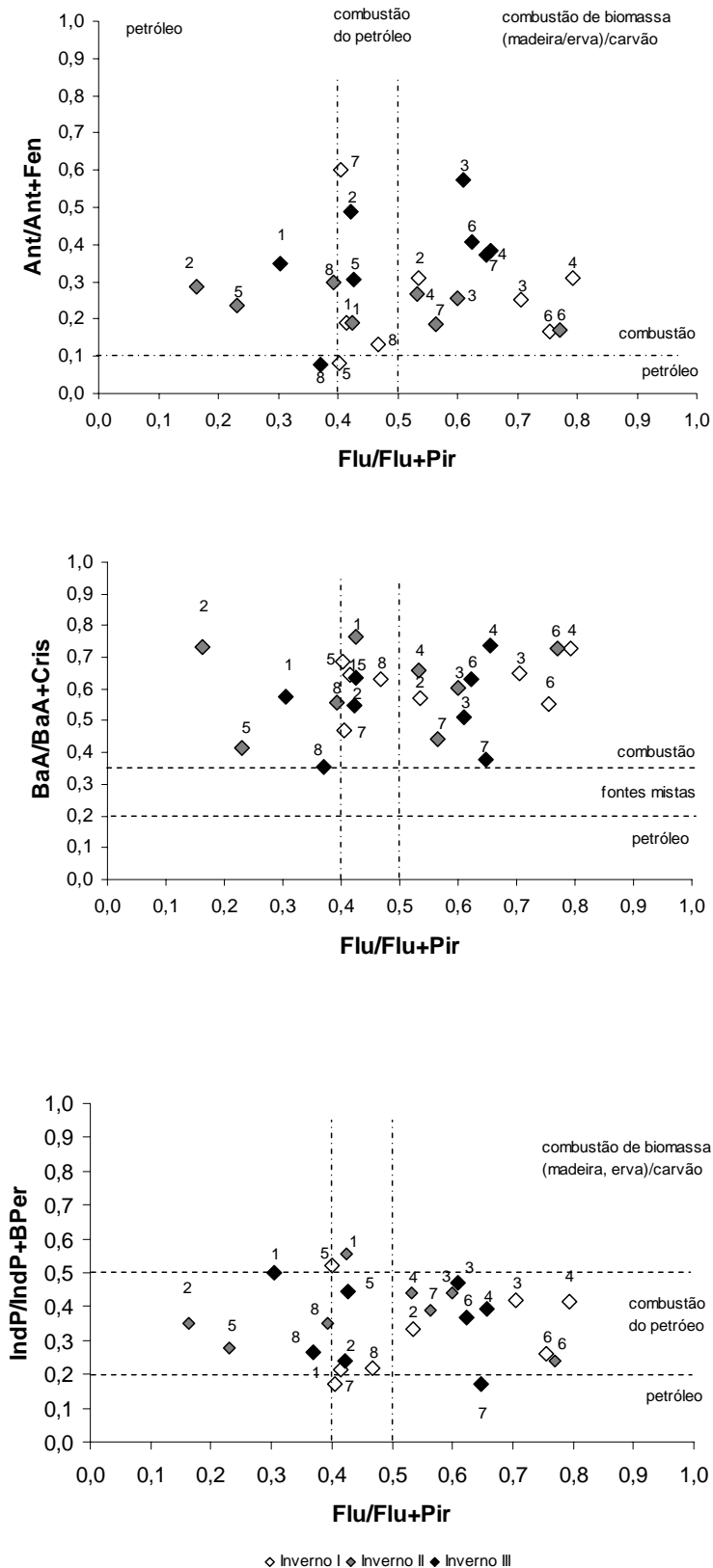


Figura 4.15 - Razões Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer em relação à razão Flu/Flu+Pir, calculadas para os mexilhões *M. galloprovincialis*, durante o estudo temporal. (1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - VRSA).

A variabilidade da razão Flu/Flu+Pir ao longo do tempo mostra que a origem dos PAHs nos mexilhões da costa Sul de Portugal podem ser diversas (petróleo, combustão do petróleo ou combustão de biomassa) mas que quando analisadas em relação às razões Ant/Ant+Fen; BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer, estas ocorrem simultaneamente com PAHs pirolíticos maioritariamente originados por combustão (Ant/Ant+Fen e BaA/BaA+Cris) e combustão do petróleo (IndP/IndP+BPer).

Do mesmo modo que no estudo anual, a análise PLS foi utilizada para clarificar as fontes de PAHs nos mexilhões. Cada uma das 22 assinaturas utilizadas (Tabela A2, Anexo) foi ajustada aos dados de PAHs individuais analisados nos três Invernos, transformados em proporção do total, cujos resultados mais representativos da variância explicada estão representados na Fig. 4.16. Comparativamente aos Invernos I e II, as variâncias explicadas pelas assinaturas no Inverno III são de um modo geral superiores, destacando-se LG, PT e FR, não excedendo nalguns locais 25%.

De um modo geral, a origem dos PAHs identificados nos mexilhões da costa Sul de Portugal durante o período temporal é semelhante ao verificado no estudo anual, isto é, as assinaturas predominantes são características de produtos petrolíferos com diferentes graus de degradação ambiental (assinaturas 1 a 7), seguidas de PAHs pirolíticos característicos de actividades portuárias (9) ou de actividades domésticas (8), bem como da queima de madeira (10 e 11).

No Inverno III as assinaturas 9, 11 e 17 explicam grande parte da variância em LG e PT, enquanto que em FR a variância é explicada principalmente por PAHs pirolíticos derivados das actividades domésticas (assinatura 8) ou petrogénicos derivados de gasóleos não queimados (assinaturas 12 e 13), assim como por PAHs derivados de petróleos (assinatura 18) e conservantes da madeira (assinatura 19). É provável que

nestes locais a origem dos PAHs esteja sobreposta (pois a variância total acumulada excede 100%), uma vez que a distribuição individual de PAHs nestas assinaturas é relativamente semelhante).

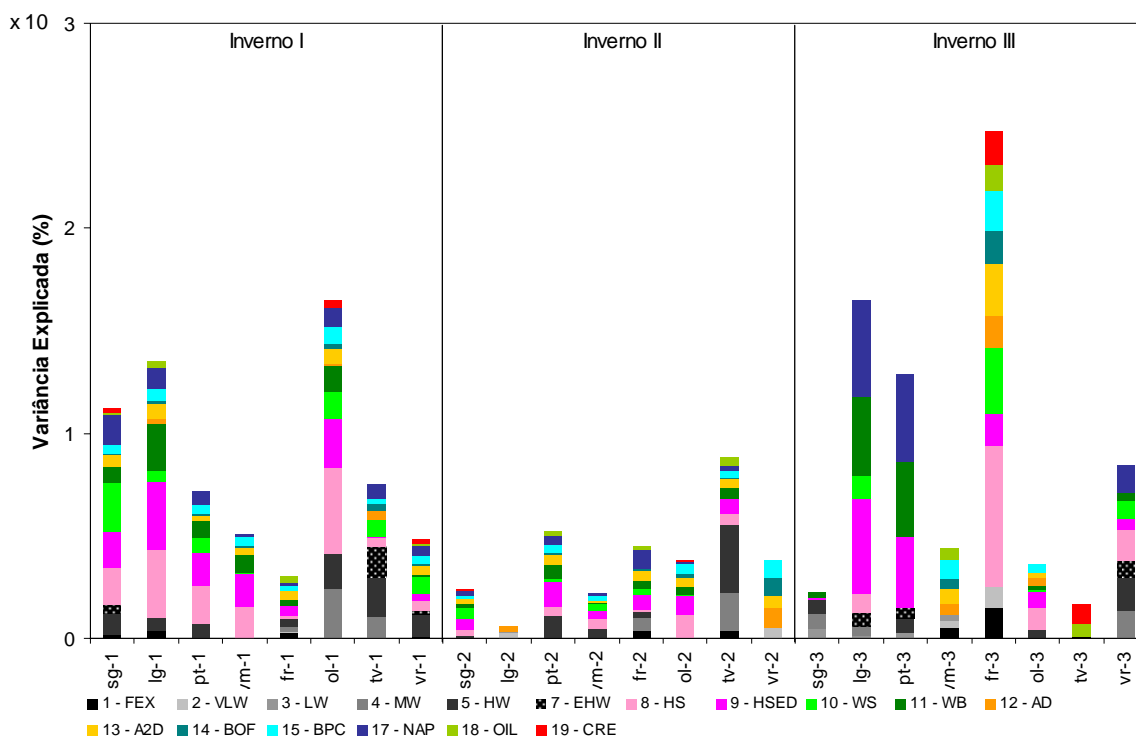


Figura 4.16 - Análise PLS das assinaturas de PAHs aplicada aos tecidos moles de *M. galloprovincialis*, durante o estudo temporal. (Abreviaturas das assinaturas como na Tabela. A2, Anexo)

Por outro lado, em TV (Inverno III) parece ter havido uma alteração nas fontes de PAHs pois a variância dos dados é explicada essencialmente por dois tipos de assinaturas que não ocorrem nos Invernos precedentes (18 e 19) e cujas variâncias acumuladas explicam somente 15% da variabilidade dos dados detectados nos mexilhões. A ocorrência esporádica de creosoto na costa Sul de Portugal pode estar associada à conservação e preservação de barcos e instalações portuárias e fluviais, embora o seu uso tenha sido restringido em 1999 (DL 446/99).

4.4 – DISCUSSÃO

Os moluscos bivalves são considerados bons indicadores de contaminação dos sistemas aquáticos. Estes organismos são capazes de concentrar certos compostos nos seus tecidos a níveis muito superiores aos encontrados na água do mar (Martin e Richardson, 1991), integrando e providenciando informação acerca das tendências da contaminação. Neste contexto, os mexilhões *M. galloprovincialis* foram usados como organismos sentinela para avaliar a distribuição, tendências e possíveis fontes de PAHs na costa Sul de Portugal, quer espacial quer sazonalmente.

A concentração total de PAHs nos tecidos dos mexilhões da costa Sul de Portugal variou entre 145 ± 27 e 5035 ± 925 ng/g ph (mediana 651 ng/g ph) no estudo anual e entre 375 ± 69 e 887 ± 122 ng/g ph (mediana 516 ng/g ph) no estudo temporal (Inverno III) e é semelhante e comparável à concentração de PAHs detectada em mexilhões da costa NW de Portugal, entre Carreço e o porto de Leixões (Lima *et al.*, 2008), e em vários locais no Mediterrâneo como em Veneza (Wetzel e van Vleet, 2004), Barcelona (Porte e Albaigés, 1993; Solé *et al.*, 1995a, b; Solé 2000; Porte *et al.*, 1991, 2001b) ou Arcachon (Baumard *et al.*, 1998a, b), assim como na costa da Galiza e na Baía da Biscaia (Soriano *et al.*, 2006; Orbea *et al.*, 1999), no mar Báltico (Näf *et al.*, 1994) e no Alasca (Varanasi *et al.*, 1990; Page *et al.*, 2005), embora os níveis mais elevados por PAHs sejam dependentes de fontes antropogénicas acidentais como derrames de petróleo (Tab. 1.4; Cap. 1). A concentração média de TPAH determinada ao longo da costa Sul de Portugal é, segundo Baumard *et al.* (1998d), considerada elevada¹ (>200 – 1000 ng/g ph) a muito elevada (>1000 ng/g ph), e é superior à encontrada em amêijoas *R. decussatus* (30,4-1191 ng/g ph) provenientes dos mesmos locais da Ria Formosa (OL e TV) (Barreira,

¹ Intervalo de valores calculados para peso húmido a partir dos valores originais em peso seco (Baumard *et al.*, 1998 d), assumindo uma proporção peso húmido/peso seco de 5:1. (≤20 ng/g ph - baixa; 20-200 ng/g ph - moderada; >200 – 1000 ng/g ph – elevada; >1000 ng/g ph – muito elevada)

2006; Barreira *et al*, 2007 b). Os PAHs acumulam-se em maior grau em tecidos ricos em lípidos, como gónadas e glândula digestiva (Livingstone, 1998). O teor médio em lípidos no mexilhão (média: 3,96%; intervalo: 3,6 – 4,2%; Fig. 4.4) é superior ao das amêijoas (0,61 - 1,21%) (Barreira, 2006), facto que pode explicar a maior acumulação de TPAH nos mexilhões. No entanto, tal como para os mexilhões, não foi encontrada uma relação significativa entre a concentração de TPAH nos tecidos das amêijoas e os teores em lípidos (Barreira, 2006). Do mesmo modo, Devier *et al*. (2005), também não detectaram qualquer relação entre os níveis de TPAH e o conteúdo lipídico em mexilhões *Mytilus spp.* recolhidos na baía de Arcachon (França). Por outro lado, outros factores como o ciclo reprodutivo, o modo e a disponibilidade de alimento, o ciclo hidrológico e os parâmetros abióticos podem influenciar o metabolismo e a acumulação diferencial de PAHs nestas espécies.

A distribuição espacial e sazonal (Fig. 4.1 e 4.2) da concentração média de TPAHs nos tecidos dos mexilhões indica que VM e OL seguidos de PT e LG são os locais da costa Sul de Portugal que apresentam maior contaminação por PAHs, tal como aconteceu no Capítulo 3, em relação à fracção alifática dos hidrocarbonetos. Esta tendência mantém-se no estudo temporal, no qual VM e OL continuam a ser os locais com níveis de PAHs mais elevados, (Fig. 4.11). Como já foi referido, VM e OL são influenciados pelo tráfego intenso relacionado com a marina e o porto de pesca (respectivamente), sendo esta uma das principais fontes de PAHs. Concentrações de PAHs elevadas foram detectadas em mexilhões recolhidos nestes locais (Bebianno *et al*, 2007; Lopes e Bebianno, 2007; Serafim *et al*, 2008) relacionadas com a navegação e actividades portuárias associadas, e/ou outras fontes, como escorrências urbanas e industriais, esgotos não tratados e efluentes das ETARs. Em LG (1056 ± 310 ng/g ph) e PT

(956 ± 809 ng/g ph), os níveis de TPAHs elevados (≈ 1000 ng/g ph) também podem estar associados às actividades piscatórias, portuárias e de lazer. De um modo geral, a concentração média de TPAH nos mexilhões em SG, FR, TV e VRSA são menores que nos locais descritos anteriormente (Fig. 4.2), mas ainda assim, classificadas como elevadas (Baumard *et al.*, 1998d). Em Sagres a influência das rotas de navegação podem contribuir para os teores de TPAH detectados (731 ± 298 ng/g ph). A concentração de PAHs nos mexilhões de FR (476 ± 178 ng/g ph) e TV (371 ± 180) é a mais baixa da costa Sul de Portugal, embora ainda se considere elevada ($>200 - 1000$ ng/g ph) (Baumard *et al.*, 1998d). Por sofrerem menores oscilações anuais e por apresentarem por vezes concentrações de PAHs <200 ng/g ph, talvez se possa classificar estes locais como moderadamente elevados. A existência do porto comercial e de um pipeline usado na transferência de combustíveis e gás para depósitos em terra, não parece aumentar a concentração de PAHs em FR. As fontes de PAHs em TV poderão ser atribuídas a escorrências urbanas e industriais e das estradas. TV tem várias pontes sobre o rio Gilão e tráfego moderado de embarcações de recreio e pesca. Em VRSA, as concentrações médias totais de PAHs (519 ± 170 ng/g ph) são também consideradas elevadas. VRSA é banhada pelo quarto maior rio da Península Ibérica, sofre influência da escorrência das chuvas, de aquaculturas, da ponte internacional, além do tráfego de barcos de pesca e recreio, de VRSA e de Espanha. Apresenta também contaminação metálica (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) que pode estar associada aos combustíveis (Company *et al.*, 2008) e/ou proveniente das minas de S. Domingos e de Las Herrerias (Company *et al.*, 2008). Outro tipo de contaminação organometálica (TBT) foi também identificado (Diez *et al.*, 2005).

A distribuição anual da concentração média de PAHs acumulada nos tecidos dos mexilhões (Fig. 4.1) indica que o Inverno I (1464 ± 819 ng/g ph) seguido do Outono

(1101±299 ng/g ph) são os meses com concentrações mais elevadas, decrescendo no Inverno II (675±426 ng/g ph), para níveis inferiores aos da Primavera (776±320 ng/g ph) e do Verão (808±379 ng/g ph), tal como verificado no Cap. 3 relativamente aos hidrocarbonetos alifáticos, podendo este facto estar associado ao ciclo reprodutivo dos mexilhões. Por outro lado, o aumento da temperatura do ar e da água do mar favorece a evaporação e degradação ambiental e bacteriana dos PAHs mais leves (2 e 3 anéis) existentes na coluna de água, alterando a biodisponibilidade individual dos PAHs, e favorecendo a bioacumulação dos PAHs de peso molecular mais elevado. Teores de TPAH superiores no Inverno-Outono e menores na Primavera-Verão foram também detectados por Porte *et al* (2000 a), associadas a períodos de chuva e ressuspensão dos sedimentos e ciclo sexual, respectivamente.

A concentração média de PAHs no Inverno III (Fig. 4.11) é na maioria dos locais semelhante à do Inverno II, excepto em VM onde se deu um decréscimo significativo. Situações pontuais com concentrações extremamente elevadas de TPAH (>1000 ng/g ph) foram detectadas em VM no Inverno I (5035±955 ng/g ph), diminuindo significativamente no período de 6 anos (82%), para valores de 887±122 ng/g ph (Inverno III), classificando-se agora como elevada (>200 - 1000 ng/g ph) (Lopes e Bebianno, 2007). Níveis de contaminação por PAHs muito elevados no Inverno I (Fig. 4.12) talvez possam estar também relacionados com elevadas ocorrências pluviais (urbanas, industriais, rurais), uma vez que no ano 1996 a pluviosidade média (1249 mm), foi muito superior à média da região (696 mm), tendo sido considerado um ano de cheias, enquanto que em 2003 foi inferior (547 mm) (ano de seca) (<http://snirh.pt>).

Quando se analisa os PAHs totais por grupo de anéis (Figuras 4.3 e 4.12) e individualmente (Tabelas 4.1 a 4.5 e 4,7), verifica-se que nos mexilhões da costa Sul de

Portugal, os PAHs predominantes são os de 4 anéis (Flu, BaA e Cris). Conjuntamente com o Pir, os compostos tetra-aromáticos representam em média 66% do TPAHs, sendo os níveis máximos em VM e OL. Ao longo do tempo a proporção média dos PAHs de 4 anéis diminui do Inverno I (68%) para o II (63%) e III (44% do TPAH), com o aumento simultâneo da proporção de PAHs de 2+3 e 5+6 anéis. Os compostos de 2+3 anéis são mais elevados em FR e TV, mas SG, LG e VRSA podem também apresentar um aumento em PAHs de 2+3 anéis, como verificado no Outono e Inverno II. Durante este período de 6 anos as maiores diferenças ocorreram em FR, onde no Inverno III os PAHs de 5+6 anéis são cerca de 51% da concentração de TPAH, e em TV onde os PAHs de 2+3 anéis representam 54% do total de PAHs. Assim, esta distribuição da concentração de PAHs na costa Sul de Portugal (Fig. 4.6, 4.7 e 4.13), é também evidenciada nas análises CCA, que mostram comportamentos distintos entre os compostos de 4 anéis relativamente aos de 2+3 e 5+6, que por sua vez são também diferentes entre si, com níveis superiores na maioria dos locais do Inverno I e Outono, relativamente à Primavera, Verão e Inverno II, principalmente devido aos PAHs pirolíticos de 4 e 5+6 anéis. O Inverno III (Fig. 4.13) é diferente do I e II pelas maiores percentagens de PAHs petrogénicos de 2+3 e pirolíticos de 5+6 anéis, destacando-se FR onde se atingiu o máximo de 5+6 anéis.

Além de se encontrarem nos petróleos (Baumard *et al*, 1999b), os compostos de 4 anéis são predominantes nos compostos formados durante a combustão incompleta dos combustíveis fósseis e biomassa. Por outro lado, os PAHs di e tri-aromáticos mais comuns nos mexilhões da costa Sul são o N, Acften, Fen, e Ant, mais solúveis que os anteriores e por conseguinte mais biodisponíveis. Os PAHs penta-aromáticos B(b)+(k)F, BaP e hexa-aromáticos (BPer e IndP) (os menos solúveis na água) são abundantes nos produtos de combustão e estão também presentes nos mexilhões da

costa Sul de Portugal. Os sedimentos da Ria Formosa, em particular na zona de OL, têm uma elevada predominância de PAHs de 4 anéis, sendo este padrão reflectido na acumulação por parte da amêijoia *R. decussatus* (Barreira *et al* 2007 a,b) e no mexilhão *M. galloprovincialis* (Serafim *et al*, 2008). Assim, os mexilhões acumularam tanto os PAHs de baixo peso molecular, que são mais solúveis, pois ao estarem associados à fracção dissolvida, podem ser acumulados nos tecidos mais rapidamente e em maior escala (Axelman *et al.*, 1999), como os PAHs de elevado peso molecular. Estes, devido à sua baixa solubilidade e elevado coeficiente de partição octanol/água, tendem a estar adsorvidos ao alimento, à matéria em suspensão e sedimentos, que ao serem redissolvidos e ressuspensos, se podem tornar mais biodisponíveis para acumulação (Alvarez-Legorreta *et al.*, 1994).

As características dos PAHs relativas à sua formação, podem ser utilizadas para determinar a sua origem, e estimar a importância relativa dos PAHs derivados do petróleo, dos derivados da combustão (matéria orgânica e/ou da combustão do petróleo) (Lipiatou e Saliot, 1991; Yunker *et al.*, 1996, 2002 b; Budzinski *et al.*, 1997). Dentro dos isómeros tri-aromáticos, o fenantreno é termodinamicamente mais estável que o antraceno. A pirólise da matéria orgânica a temperaturas muito elevadas gera PAHs caracterizados por uma razão Fen/Ant baixa (<10), enquanto que a formação lenta do petróleo a temperaturas baixas leva a valores muito mais elevados da razão Fen/Ant ($>10 - 25$) (Raoux, 1999; Page *et al.*, 2006). Do mesmo modo, o fluoranteno (Flu) e o pireno (Pir) são considerados produtos típicos da pirólise, gerados a partir da condensação a altas temperaturas dos compostos de baixo peso molecular (Page *et al.*, 1999). Durante a combustão o pireno é mais estável que o fluoranteno, portanto um predomínio de Flu sobre o Pir é característico de produtos pirolíticos (Fen/Pir >1), enquanto que nos PAHs derivados do petróleo o Pir é mais abundante que o Flu (Flu/Pir

<1) (Tab. 4.6) (Budzinski *et al*, 1997; Baumard *et al*, 1999; Soclo *et al*, 2000; Porte *et al*, 2001).

As razões Fen/Ant e Flu/Pir calculadas para os mexilhões da costa Sul de Portugal, variaram entre 0,60-16,68 e 0,11–3,83, respectivamente (Tab. A1 – Anexo), indicando fontes de PAHs petrogénicas, pirolíticas e mistas (Fig. 4.8 e 4.14), mas ao longo do tempo as fontes pirolíticas predominam (Flu/Pir >1), não havendo separação entre estações do ano. Certos autores verificaram uma tendência para as razões Fen/Ant e Flu/Pir indicarem origens petrogénicas no Verão (relacionadas com menores concentrações totais de PAHs) e pirolíticas no Inverno (relacionadas com as maiores concentrações totais de PAHs) (Bouloubassi *et al*, 1997; Bodin *et al*, 2004). Espacialmente, em VM e OL a origem é sempre pirolítica durante todo o período (anual e temporal), seguindo-se PT e LG, enquanto que FR apresenta características petrogénicas no Inverno I, Primavera, Verão e VRSA na Primavera e Inverno III. A razão Flu/Pir <1 em SG, FR e TV indicadora de PAHs petrogénicos coincide com valores da razão Fen/Ant <10 (PAHs pirolíticos), pelo que nestes locais as fontes de PAHs são mistas. Fontes mistas (pirolíticas e/ou petrogénicas) de PAHs foram também detectadas nos sedimentos e amêijoas da Ria Formosa (Barreira, 2006; Barreira *et al*, 2007 a, b) assim como em mexilhões recolhidos na costa Sul (Serafim *et al*, 2008) e NW de Portugal (Lima *et al*, 2007, Lima *et al.*, 2008) (Tab. 1.4 – Cap. 1), associados a portos, escorrências urbanas e industriais e/ou deposição atmosférica. PAHs com origens mistas existem também em mexilhões recolhidos na Dinamarca (Granby e Spliid, 1995), no mar Báltico (Näf *et al.*, 1994; Baumard *et al.*, 1999 b), no Mediterrâneo, em Espanha (Porte *et al.*, 1991), França (Baumard *et al.*, 1998 a, b), Itália (Solé *et al.*, 2000 a; Wetzel e van Vleet, 2004) e na costa marroquina (Azdi *et al*, 2006), assim como noutros locais que sofrem impacto de portos e marinas ou em zonas

costeiras e industriais com elevado tráfego marítimo ou sujeitas a derrames de petróleo (Page *et al.*, 1998, Page *et al.*, 2002 a,b)

Outras razões de diagnóstico, para além das referidas anteriormente, baseadas na massa molar dos isómeros de PAHs, também têm sido utilizadas para distinguir de entre os PAHs pirolíticos, os derivados da combustão de biomassa dos derivados da combustão do petróleo. Assim, valores da razão antraceno/antraceno + fenantreno (massa 178) menores que 0,10 são usualmente tomadas como indicadora de petróleo não queimado, enquanto que valores superiores a 0,10 indicam um domínio do efeito da combustão (Gschwend e Hites, 1981; Oros e Ross 2005, Spovieri *et al.*, 2007). A razão fluoranteno/fluoranteno+pireno (massa 202) é menor que 0,50 para a maioria das amostras contaminadas com petróleo não queimado e superior a 0,50 para querosene, combustão de madeiras e carvão e creosoto, mas situa-se no intervalo 0,40 – 0,50 para combustão de gasolina, gasóleo, fuel oil e petróleo, e emissões provenientes de carros e camiões a gasóleo (Tab. 4.6) (Yunker *et al.*, 2002b; Oros e Ross 2005, Spovieri *et al.*, 2007). Os PAHs de massa 228 (benzo(a)antraceno e criseno) e 276 (indeno(1,2,3-cd)pireno e benzo(g,h,i)perileno) são usados menos frequentemente como indicadores das fontes pirolíticas de PAHs, no entanto estes PAHs de elevado peso molecular são constituintes mínimos nos produtos petrolíferos refinados (Williams *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1999a,b) e geralmente estão presentes em quantidades significativas nos asfalto (Readman *et al.*, 2002), e possivelmente no betume e carvão (Yunker *et al.*, 1996, 2002 ab). Nas emissões de veículos a gasóleo, estes PAHs de elevado peso molecular também estão presentes (Abrantes *et al.*, 2004). Valores da razão BaA/BaA+Cris menores que 0,20 indicam petróleo, de 0,20 a 0,35 indicam ou petróleo ou combustão (isto é, mistas) e maiores que 0,35 implicam combustão (Tab. 4.6) (Yunker *et al.*, 2002). No que diz respeito à razão IndP/IndP+BPer valores acima de 0,50 são referenciados para

combustão de erva, madeira e carvão, enquanto que produtos da combustão de gasolina, querosene, gasóleo e crude oil têm valores abaixo dos 0,50, com emissões de veículos no intervalo entre 0,24 e 0,40. Assim, esta razão delimita-se nos $<0,20$ para petróleos, entre 0,20 e 0,50 para combustão de combustíveis fósseis líquidos (veículos e crude) e $>0,50$ implica combustão de biomassa (Tab. 4.6) (Yunker *et al*, 2002 b; Oros e Ross, 2005; Oros *et al*, 2006).

As razões diagnóstico Ant/Ant+Fen; Flu/Flu+Pir, BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer (Fig. 4.9 e 4.15; Tab. A1 - Anexo), confirmam que os PAHs acumulados nos tecidos dos mexilhões da costa Sul de Portugal têm origem tanto petrogénica como pirolítica, sendo esta última tanto devido à combustão de biomassa como de combustíveis. Os valores da razão Flu/Flu+Pir oscilaram entre 0,10 e 0,79 (média 0,49- Tab. A1 – Anexo), indicando a presença de PAHs do petróleo (Flu/Flu+Pir $<0,4$), da combustão do petróleo (Flu/Flu+Pir entre 0,4 e 0,5) e da combustão de biomassa ou carvão (Flu/Flu+Pir $>0,5$), não havendo diferenciação sazonal ou espacial ao longo do tempo. Por outro lado, as razões Ant/Ant+Fen, BaA/BaA+Cris e IndP/IndP+BPer indicam PAHs maioritariamente originados da combustão do petróleo e/ou produtos refinados, em ambos os períodos de tempo estudados. Além disso, locais como VM, OL e TV (entre outros) apresentam valores da razão Flu/Flu+Pir $>0,5$ (combustão de biomassa) coincidentes com valores da razão Ant/Ant+Fen $>0,1$ (combustão), da razão BaA/BaA+Cris $>0,35$ (petróleo+combustão) e a razão IndP/IndP+BPer entre 0,2 e 0,5 (combustão do petróleo), confirmando as fontes mistas dos PAHs acumulados (petrogénicas e pirolíticas). Deste modo, nos mexilhões da costa Sul coexistem PAHs pirolíticos derivados da combustão de biomassa (incêndios, queimadas, lenha, carvão, resíduos) como dos derivados da combustão dos produtos petrolíferos (gasóleo, gasolina, óleos) por veículos motorizados (carros, motacicletas, motos de água, barcos).

Estes resultados são consistentes com outros estudos, onde várias fontes de PAHs foram identificadas, como tráfego marítimo, produtos de combustão de origem doméstica (carvão, madeira) e fogos florestais (Barreira *et al*, 2007 b,c; Serafim *et al*, 2008).

Uma vez que cada processo de formação gera um perfil característico na composição e proporção dos PAHs individuais, e dado que nesta dissertação foram identificados PAHs do petróleo, da combustão do petróleo e da combustão de biomassa, estes resultados foram comparados com assinaturas típicas (análise PLS) (Tab. A2 – Anexo) quer de petróleos com diferentes graus de contaminação ambiental (como verificado no Cap. 3), como de PAHs presentes em amostras puras de crude, gasóleo ou creosoto (utilizado na preservação das madeiras), assim como originados pela queima de carvão ou após um incêndio florestal. Como as zonas portuárias têm um elevado tráfego marítimo, sendo os seus sedimentos contaminados com PAHs pirolíticos de 4, 5 e 6 anéis derivados da queima dos combustíveis, foram também utilizadas assinaturas provenientes de portos e zonas industriais. Por outro lado, dado que a produção e utilização de energia eléctrica podem ser uma fonte de PAHs para a atmosfera, foi também utilizado uma assinatura deste tipo, referente à utilização doméstica.

Os mexilhões da costa Sul de Portugal (Fig. 4.10 e 4.16) acumularam PAHs derivados do petróleo com diferentes graus de degradação (com um predomínio de compostos de baixo peso molecular de 2 e 3 anéis) (assinaturas 1 a 7), confirmando os resultados do Capítulo 3, onde foram identificados locais com níveis elevados de contaminação por hidrocarbonetos alifáticos, o que indica a presença de petróleos. Este tipo de PAHs ocorre em toda a costa e durante o período anual e temporal, apresentando variâncias elevadas em PT e OL na Primavera e FR no Outono, sendo as únicas assinaturas relevantes no primeiro e último caso. Indicam a presença de PAHs ambientalmente

degradados resultantes das actividades náuticas ou portuárias. Podem no entanto, provir também de derrames acidentais de petróleo (ou limpeza de tanques) ocorridos na costa Sul (Fig. 1.5 e 1.6 – Cap. 1). Page *et al.* (1999) e Burns *et al.* (1997) indicaram a presença de petróleo com diferentes graus de degradação em diferentes locais do Alasca, alguns anos após o derrame do Exxon Valdez em 1989. Outra fonte de PAHs de 2 e 3 anéis petrogénicos são os dos produtos do petróleo não queimado, como o gasóleo (assinaturas 12 e 13) ou o creosoto (assinatura 19). O primeiro está presente ao longo da costa e em todos os meses, sendo a variância explicada superior em VRSA no Inverno II. Pode estar relacionada tanto as actividades portuárias, como pelas escorrências das estradas, uma vez que parte do combustível é emitido pelos escapes sem ter sofrido pirólise (Abrantes *et al.*, 2004). O creosoto só aparece esporadicamente, no Inverno I e III, e pode estar relacionado com actividades de preservação das embarcações de madeira. Confirma-se também a presença de PAHs pirolíticos quer da combustão de petróleo e derivados (assinatura 9), das actividades domésticas (assinatura 8) quer da combustão de madeira/carvão (biomassa) (assinatura 10 e 11), todas ricas em PAHs de 4, 5 e 6 anéis. Estes tipos de assinaturas estão presentes durante todos os meses e épocas do ano, sendo a queima de biomassa superior no Inverno III em LG e PT. A sua presença talvez possa estar relacionada com o transporte atmosférico resultante dos incêndios florestais que todos os anos assolam as Serras de Monchique e do Caldeirão. De facto, nos incêndios de 2003 arderam cerca de 62.200 ha, contra os 526 ha. em 1996 e os 263 ha. em 1997 (CCDRA, 2004), cujos concelhos de Monchique, Silves, Lagos, Portimão e Aljezur foram os mais afectados, mas também os concelhos de Vila do Bispo, Loulé, Castro Marim, Alcoutim, Tavira e VRSA. Por outro lado, o transporte de compostos orgânicos pelas correntes oceânicas também se pode fazer notar, na medida em que PAHs presentes na fracção particulada de amostras de água do Atlântico Norte

(assinatura 17) estão presentes em toda a costa, sendo particularmente elevada em LG e PT no Inverno III. Este tipo de PAHs foi detectado nas correntes oceânicas que entram no Mediterrâneo (Lipiatou *et al*, 1997).

Deste modo a análise PLS confirma os resultados das razões diagnóstico na identificação da origem dos PAHs nos mexilhões da costa Sul, sendo os PAHs pirolíticos provenientes da combustão da biomassa e combustão de combustíveis fósseis, que chegam ao meio marinho por deposição atmosférica, escorrências urbanas e tráfego marítimo costeiro. A análise PLS confirma também a presença de PAHs petrogénicos com origem no petróleo/crude e/ou produtos refinados puros (gasolina, gasóleo, outros), com vários graus de degradação ambiental que podem decorrer das actividades portuárias como pequenos derrames durante o abastecimento de combustível aos barcos, ou durante as transfeças comerciais para os depósitos locais.

4.5 – CONCLUSÕES

A concentração total de PAHs nos tecidos dos mexilhões *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal são considerados elevados a muito elevados, tendo vindo a decrescer ao longo do tempo (82% em VM). A concentração é superior em VM e OL, na maioria dos casos, relativamente a outros locais. FR e TV apresentam níveis de PAHs menores. Os Invernos e o Outono parecem ser as estações do ano em que a concentração de PAHs é mais elevada.

Os PAHs predominantes em toda a costa são os de 4 anéis, seguindo-se os de 5+6 e 2+3. No entanto no Inverno III a proporção de PAHs de 2+3 anéis aumentou em todos

os locais, excepto em FR, onde os PAHs de 5+6 anéis são predominantes. Dos PAHs individuais, o BaA, Flu e Cris são predominantes. O BaP (cancerígeno e mutagénico) está presente em todas as amostras, por vezes em concentrações elevadas. Dos PAHs de baixo peso molecular (2 e 3 anéis) o acenafteno é o principal.

As razões de diagnóstico entre pares de isómeros indicam a existência de fontes petrogénicas e pirolíticas de PAHs, em toda a costa e ao longo do tempo. VM e OL apresentam características maioritariamente pirolíticas e FR e TV maioritariamente petrogénicas. As fontes pirolíticas identificadas têm origem na combustão de produtos do petróleo e da biomassa.

As fontes de PAHs para o meio marinho podem ser derivadas das actividades domésticas (ETARs, drenagem urbana), do tráfego marítimo e actividades portuárias, queima de biomassa proveniente dos incêndios e da utilização de carvão e lenha, e de produtos de petróleo não queimado, proveniente de derrames nas zonas portuárias.

**5 – O SISTEMA MFO NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO ORGÂNICA
EM MEXILHÕES *Mytilus galloprovincialis* DA COSTA SUL DE PORTUGAL**

5.1 – INTRODUÇÃO

A análise química é útil para medir quantitativamente os contaminantes antropogénicos de uma forma sensível e selectiva. No entanto, a quantidade de contaminantes nos tecidos dos organismos muitas vezes não reflectem o impacto real que exercem sobre os mesmos, uma vez que as taxas de metabolização dependem dos compostos em si e dos organismos estudados. Os biomarcadores, por seu lado, são capazes de avaliar o impacto do contaminante e dos seus metabolitos, sendo uma resposta sensível e mensurável em qualquer nível de organização biológica (bioquímico, celular, fisiológico, etc) que podem ser associados ao impacto dos contaminantes.

Todos os organismos possuem um conjunto de enzimas transformadoras, geralmente presentes no fígado (vertebrados), hepatopâncreas (crustáceos) ou glândula digestiva (moluscos), ou em tecidos envolvidos no processamento dos alimentos (Di Giulio *et al.*, 1995). A principal função destas enzimas é converter compostos orgânicos hidrofóbicos e altamente lipofílicos em metabolitos excretáveis hidrofílicos. As enzimas da fase I da biotransformação (oxidação, redução, hidratação e hidrólise) introduzem (ou modificam) um grupo funcional (-OH, -COOH, -NO₂, etc.) ao contaminante, ao qual as conjugases ou outras enzimas da fase II se associam para formar um composto polar (Di Giulio *et al.*, 1995). A biotransformação afecta o tempo de residência e toxicidade (desintoxicação ou activação) desses contaminantes nos organismos (Livingstone, 1998).

A indução da isoforma CYP1A por PAHs, PCBs, dioxinas e outros contaminantes tem sido usada como biomarcador de exposição em fígado de roedores (Qualls *et al.*, 1998), aves (Walker, 1998), répteis (Ertl e Winston, 1998) e peixes (Livingstone, 1993, 1996, Hahn e Stegeman, 1994, Bucheli e Fent, 1995, Goksøyr, 1995, Livingstone e Goldfarb, 1998). Embora o sistema MFO e as suas isoformas de CYP esteja muito menos

caracterizado nos invertebrados aquáticos, existe de uma proteína do tipo CYP1A, induzível por PAHs e PCBs na glândula digestiva de *Mytilus* sp e de outras espécies de moluscos (Livingstone, 1996; Livingstone e Goldfarb, 1998). Os componentes do sistema dependente do CYP450 nos moluscos têm, assim, o potencial para ser usado como biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos do petróleo (Narbonne *et al.*, 1991; Livingstone *et al.*, 1995; Solé *et al.*, 1998; Solé, 2000; Cajaraville *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2001ab).

Pretende-se neste Capítulo analisar a variação espacial, sazonal e temporal da concentração de citocromo P450 e das restantes componentes do sistema MFO, no mexilhão *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal. A capacidade do CYP450 ser usado como biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos foi avaliada pela relação entre os resultados obtidos e os teores totais e individuais dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs - Cap. 3) e aromáticos policíclicos (PAHs – Cap. 4), nos mesmos locais e épocas do ano.

5.2 – MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de 20 mexilhões foram recolhidas ao longo da costa Sul de Portugal (Fig. 2.1; Cap. 2), durante um ano consecutivo (de Fevereiro de 1996 a Fevereiro de 1997: distribuição anual) e pontualmente 6 anos depois (Dezembro de 2003: distribuição temporal). Os organismos foram transportados vivos para o laboratório a 4 °C. Amostras

compostas de 5 glândulas digestivas (em triplicado) foram dissecadas e congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C até análise posterior.

O fraccionamento subcelular e o método analítico encontram-se descritos no Capítulo 2. Os componentes do sistema MFO foram analisados na fracção microsossomal da glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* por espectrofotometria UV-Vis. A concentração total de citocromo P450 (CYP450) e do pico “418” (P418) foi quantificada pela diferença de espectro de monóxido de carbono (CO) entre amostras reduzidas com ditionite de sódio (Livingstone, 1988). Segundo Livingstone e Farrar (1984), o pico a 418 nm (416-420 nm) pode ser devido a uma molécula resultante da quebra do citocromo P450, e foi quantificado em termos de unidades arbitrárias (u.a) por mg de proteína. O citocromo b₅ (Cit b₅) foi quantificado medindo a diferença de absorvância entre os 409 e os 425 nm, com um coeficiente de extinção de 185 mM⁻¹cm⁻¹ (Estabrook & Werringloer, 1978). A actividade das enzimas reductases - NADPH-citocromo c P450-reductase (NADPH-red) e NADH-citocromo b₅-reductase (NADH-red) - foi determinada através do aumento de absorvância a 550 nm provocada pela redução do citocromo c, com um coeficiente de extinção $\epsilon=19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Shimakata *et al.*, 1972). Os resultados (média \pm desvio padrão) dos citocromos P450 e Cit b₅ estão expressos em pmol/mg prot e as actividades das reductases em nmol/min/mg prot.

A diferença da concentração dos diferentes componentes do sistema MFO nas glândulas digestivas dos mexilhões, entre locais e meses, foi avaliada pela análise de variância (ANOVA). Aos resultados da ANOVA foi aplicado o teste de Duncan, para um nível de significância de 0,05, através do programa Statistica 5.0. A distribuição espacial, sazonal e temporal foi avaliada pela Análise dos Componentes Principais (PCA) e pela Análise Canónica, utilizando o programa Canoco (Ter Braak, 1995). A relação entre os

diferentes componentes do sistema MFO, e entre estes e a concentração de hidrocarbonetos (totais e individuais) foi estudada pela análise de regressão linear e por análise multivariada.

5.3 - RESULTADOS

5.3.1 - Distribuição Anual

A - Citocromo P450 (CYP450)

A concentração de CYP450 nas fracções microssomais da glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos durante um ano na costa Sul de Portugal, está representada na Figura 5.1 e Tabela A3 (Anexo).

No que diz respeito à variação espacial, verifica-se que as concentrações de CYP450 são superiores em VM e OL relativamente aos restantes locais, com PT e VRSA a apresentar por vezes concentrações elevadas. FR e TV são os locais com menores teores de CYP450.

No Inverno I, a distribuição espacial oscila entre $20,2 \pm 2,3$ pmol/mg prot (TV) e $54,1 \pm 10,7$ pmol/mg prot (VM), com uma média mensal de $30,1 \pm 11,1$ pmol/mg prot. Tal como para os hidrocarbonetos alifáticos (Cap. 3) e aromáticos policíclicos (Cap. 4), VM ($54,4 \pm 10,7$ pmol/mg prot) e OL ($38,4 \pm 6,3$ pmol/mg prot) são os locais onde a concentração total de CYP450 é superior, significativamente diferente entre si e entre os restantes locais ($p < 0,05$), em que a concentração de CYP450 é semelhante ($p > 0,05$).

Na Primavera ($20,4 \pm 8,1$ pmol/mg prot) a concentração de CYP450 é menor que a do Inverno I, com o máximo nos mesmos locais (VM $38,2 \pm 5,5$ pmol/mg prot e OL $30,9 \pm 3,5$ pmol/mg prot). Os níveis de CYP450 são menores e semelhantes em SG e TV ($15,7 \pm 1,6$ e $15,6 \pm 2$ pmol/mg prot; $p > 0,05$).

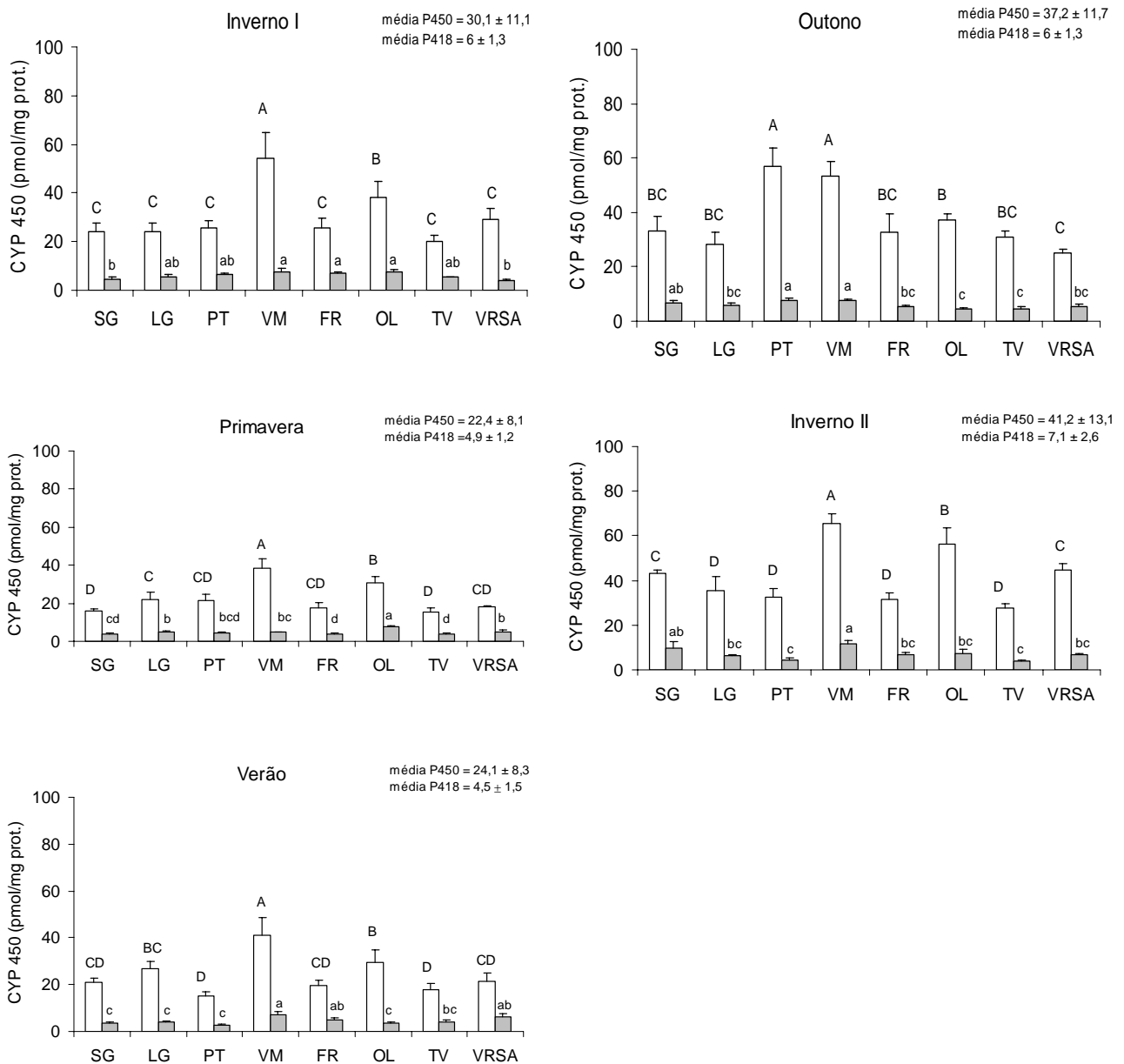


Figura 5.1 - Variação espacial da concentração total de citocromo P450 (pmol/mg prot) (barras brancas) e P418 (ua/mg prot) (barras cinza) (média \pm desvio padrão) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)

A concentração de CYP450 no Verão continua a ser superior em VM ($41,2 \pm 7,3$ pmol/mg prot) ($p < 0,05$), seguida de OL ($29,5 \pm 5,4$ pmol/mg prot), cujas concentrações são diferentes entre si, e entre os restantes locais ($p < 0,05$), embora em LG ($26,9 \pm 3,1$ pmol/mg prot) seja semelhante a OL ($p > 0,05$). Os restantes locais apresentam concentrações de CYP450 que oscilam entre $15,1 \pm 1,7$ (PT) e $20,9 \pm 2$ pmol/mg prot (SG) ($p > 0,05$). No Outono (média $37,2 \pm 11,7$) a concentração aumentou relativamente aos meses anteriores, sendo PT ($57 \pm 6,6$ pmol/mg prot) e VM ($53,3 \pm 5,6$ pmol/mg prot) os locais onde a concentração é superior e semelhante ($p < 0,05$), seguidos de OL ($37,2 \pm 2,1$ pmol/mg prot) e dos restantes locais. VRSA apresenta os níveis de CYP450 mais baixos ($25,1 \pm 1,5$ pmol/mg prot). No Inverno II, VM ($65,3 \pm 4,5$ pmol/mg prot) e OL ($56,4 \pm 7,3$ pmol/mg prot) continuam a ser os locais onde os níveis de CYP450 são superiores e significativamente diferentes entre si e entre os restantes locais ($p < 0,05$), seguidos de SG ($43 \pm 1,7$ pmol/mg prot) e VRSA ($44,8 \pm 2,7$ pmol/mg prot) ($p > 0,05$), sendo o mínimo em TV ($27,7 \pm 2,1$ pmol/mg prot), tal como no Inverno I. As concentrações médias de CYP450 são superiores às ocorridas no Outono e nos meses anteriores.

Quanto à variação sazonal da concentração total de CYP450 na glândula digestiva de *M galloprovincialis* nos diferentes locais (Fig. 5.2), verifica-se que, de uma maneira geral, os níveis decrescem do Inverno I para a Primavera e o Verão, aumentando no Outono e posteriormente no Inverno II, em todos os locais.

Em SG a concentração de CYP450 aumenta de $23,9 \pm 3,8$ para $43 \pm 1,7$ pmol/mg prot do Inverno I para o II (44,4%), enquanto que em LG aumenta de $24 \pm 3,7$ para $35,4 \pm 6,2$ pmol/mg prot (32,2%) ($p < 0,05$). Em PT a concentração aumentou até ao Outono, onde

se atingiu o máximo ($57 \pm 6,4$ pmol/mg prot), decrescendo no Inverno II ($32,3 \pm 3,9$ pmol/mg prot).

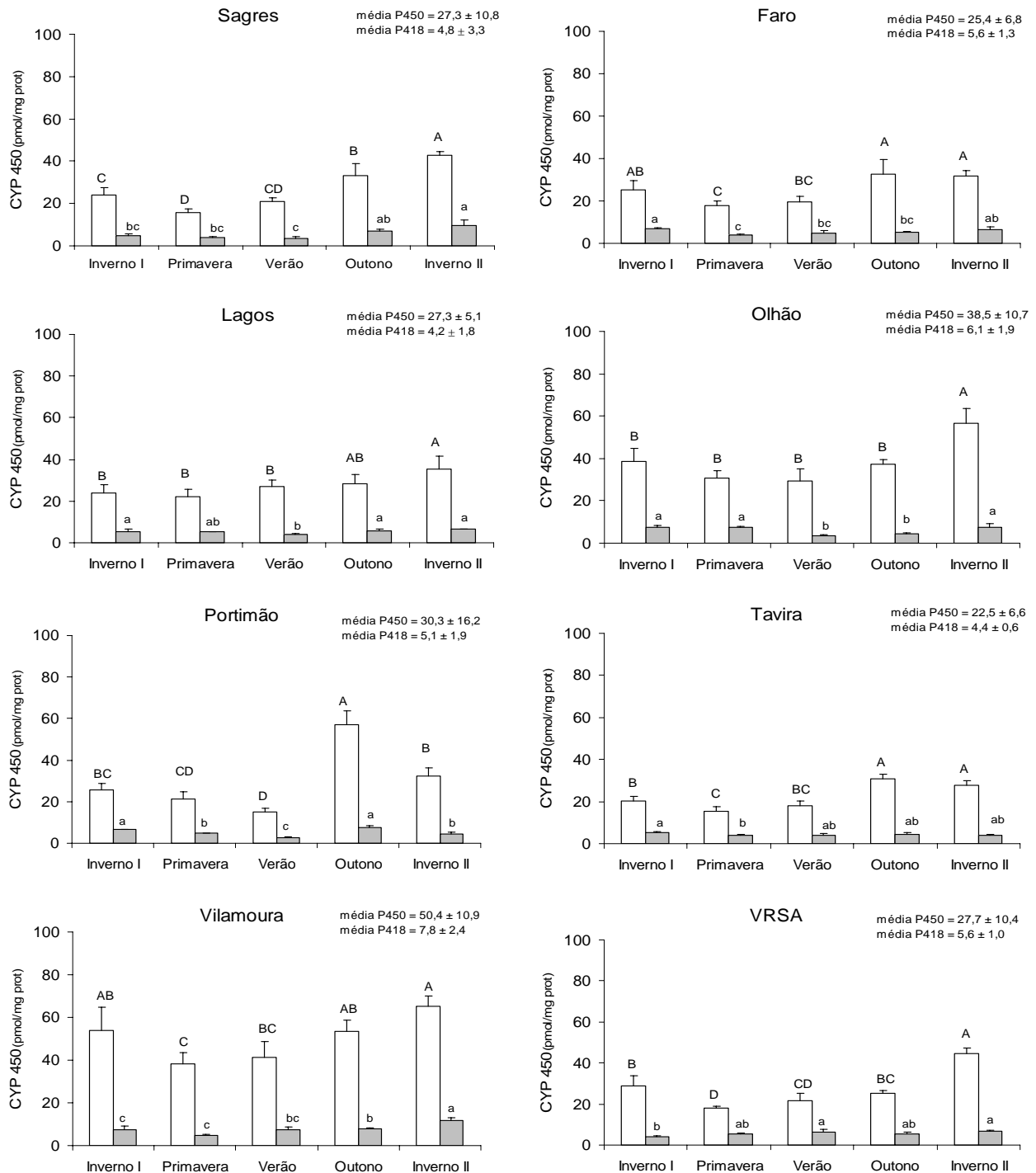


Figura 5.2 - Variação sazonal da concentração total de citocromo P450 (pmol/mg prot) (barras brancas) e “P418” (ua/mg prot) (barras cinza) (média ± desvio padrão) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan’s test $p < 0,05$).

VM e OL apresentam concentrações médias de CYP450 ($50,4 \pm 10,9$ e $38,5 \pm 10,7$ pmol/mg prot, respectivamente) superiores às dos restantes locais ($p < 0,05$), aumentando do Inverno I para o II (17,2% e 31,9%, respectivamente). FR ($25,4 \pm 6,8$ pmol/mg prot) e TV ($22,5 \pm 6,6$ pmol/mg prot) são os locais onde ao longo do ano a concentração média de CYP450 é menor, aumentando do Inverno I para o II (19,6 e 27,1%, respectivamente), enquanto que em VRSA o aumento é de 35,3%.

B – Pico 418 (P418)

A concentração de P418 representa entre 10 a 20% da concentração de total CYP450 e a sua variação espacial ao longo do ano é semelhante à de CYP450 (Fig. 5.1; Tab. A3 (Anexo)). No Inverno I ($6 \pm 1,3$ ua/mg prot), na Primavera ($4,9 \pm 1,2$ ua/mg prot), e no Verão ($4,5 \pm 1,5$ pmol/mg prot) a concentração média de P418 é semelhante entre todos os locais, aumentando no Outono ($6 \pm 1,3$ pmol/mg prot) e Inverno II ($7,1 \pm 2,6$ pmol/mg prot), tal como ocorrido para o CYP450. A variação sazonal do P418 (Fig. 5.2) nos 8 locais é semelhante à variação do CYP450, sendo idêntica em todos os locais, com um máximo em VM ($7,8 \pm 2,4$ pmol/mg prot) e OL ($6,1 \pm 1,9$ pmol/mg prot).

C – NADPH-citocromo *c*-reductase (NADPH-red)

Os resultados da actividade da NADPH-red nas fracções microsossomais das glândulas digestivas de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos durante um ano consecutivo na costa Sul de Portugal, estão representados na Figura 5.3 e Tabela A3 (Anexo).

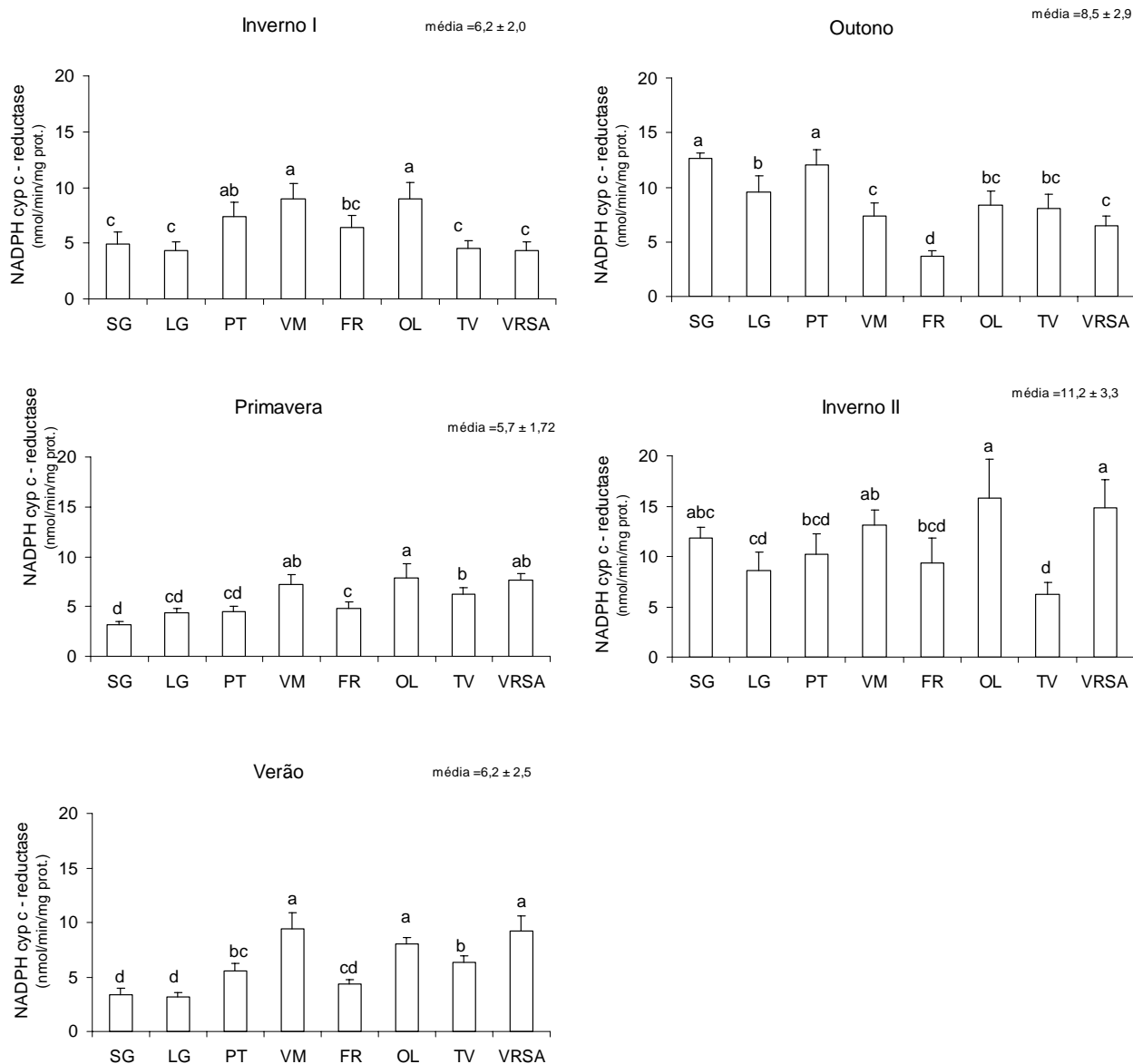


Figura 5.3 – Variação espacial da actividade da NADPH-cit *c*-reductase (média \pm desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)

O padrão da variação espacial da actividade da enzima NADPH-red ao longo dos meses é idêntico ao do CYP450, com máximos da actividade desta enzima em VM e OL na maioria dos meses, seguida de VRSA, SG, PT e LG. A actividade mais baixa registou-se, tal como para CYP450 e P418, em FR e TV.

No Inverno I actividade da NADPH-red é mínima e semelhante em LG e VRSA ($4,37 \pm 0,8$ e $4,38 \pm 0,8$ nmol/min/mg prot, respectivamente) e máxima em VM e OL ($9,0 \pm 1,31$ e $8,95 \pm 1,5$ nmol/min/mg prot, respectivamente) ($p < 0,05$), com valores médios de $6,2 \pm 2$ nmol/min/mg prot).

Na Primavera a actividade média da enzima NADPH-red ($5,7 \pm 1,7$ nmol/min/mg prot) é semelhante à ocorrida no Inverno I, registando-se as actividades máximas em VM, OL e VRSA ($7,2 \pm 1$ a $7,8 \pm 1,4$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$). A actividade é menor em SG, LG e PT ($3,1 \pm 0,4$ a $4,5 \pm 0,5$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$).

No Verão a variação média espacial da NADPH-red ($6,2 \pm 2,5$ nmol/min/mg prot) é semelhante à da Primavera e Inverno I ($p > 0,05$) com máximos em VM, OL e VRSA, sendo os valores da mesma ordem de grandeza ($8 \pm 0,61$ a $9,4 \pm 1,53$ nmol/min/mg prot) ($p > 0,05$). A actividade da NADPH-red aumenta em todos os locais do Verão para o Outono ($8,5 \pm 2,9$ nmol/min/mg prot), tal como ocorreu com o CYP450, apresentando algumas diferenças espaciais relativamente aos meses anteriores. Assim, a actividade de NADPH-red é máxima em SG e PT ($12,6 \pm 0,5$ e $12 \pm 1,4$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$) e significativamente diferente das de LG ($9,6 \pm 1,4$ nmol/min/mg prot) e VM ($7,4 \pm 1,2$ nmol/min/mg prot). FR é o local onde a actividade da NADPH-red é menor ($3,7 \pm 0,5$ nmol/min/mg prot; $p < 0,05$). Os valores da actividade desta enzima continuam a aumentar do Outono para o Inverno II ($11,2 \pm 3,3$ nmol/min/mg prot) ($p < 0,05$), mantendo a actividade máxima em OL ($15,8 \pm 3,9$ nmol/min/mg prot) e VRSA ($14,8 \pm 2,8$ nmol/min/mg prot) e mínima em TV ($6,2 \pm 1,2$ nmol/min/mg prot) ($p < 0,05$).

A variação sazonal da actividade da NADPH-red (Fig. 5.4) é semelhante entre o Inverno I, a Primavera e o Verão ($p > 0,05$), aumentando posteriormente no Outono e no Inverno seguinte ($p < 0,05$), onde se registam os valores máximos.

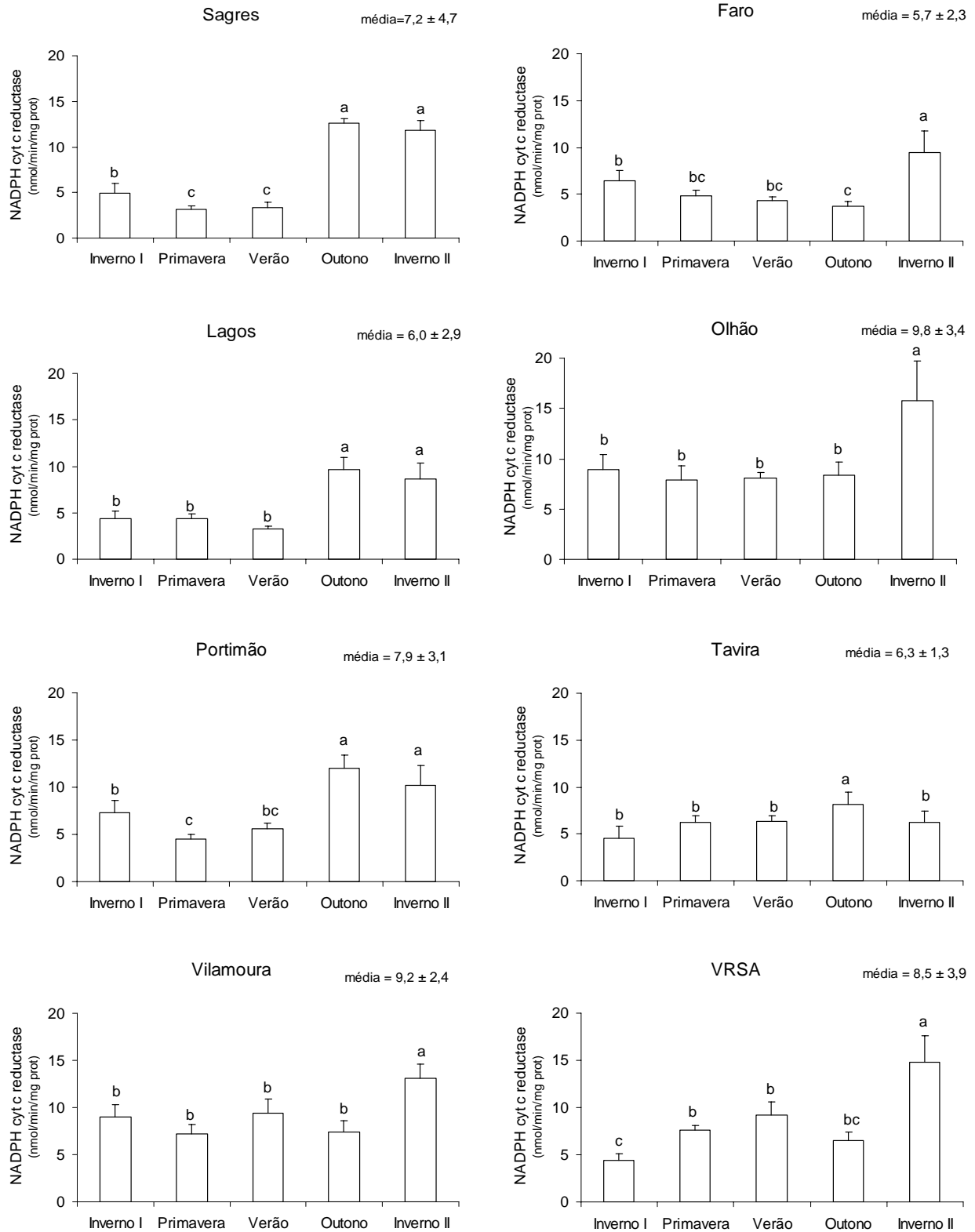


Figura 5.4 –Variação sazonal da actividade da NADPH cit *c* reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)

O padrão sazonal da distribuição da actividade da enzima NADPH-red é igual ao padrão do CYP450, evidenciando uma associação mútua. A média anual da actividade da NADPH-red é superior em OL, VM e VRSA, aumentando 43, 31 e 70%, respectivamente, do Inverno I para o II.

D - Citocromo b₅ (Cit b₅)

Na Figura 5.5 e Tabela A3 (Anexo) estão representados os resultados obtidos para o Cit b₅ na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos ao longo da costa Sul de Portugal durante um ano consecutivo. De um modo geral, a distribuição espacial das concentrações de Cit b₅ não parece ter um padrão definido, na medida em que os vários locais ao longo do ano apresentam tanto concentrações máximas como mínimas, não havendo predominância clara de uns sobre os outros. No entanto, VM parece ser o local onde as concentrações são máximas, tal como ocorreu para o CYP450, enquanto que o Outono é a estação do ano com actividades médias superiores ($25,6 \pm 4,7$).

No que diz respeito à variação espacial do Cit b₅ no Inverno I, a concentração máxima verifica-se em VM ($26,6 \pm 4,5$ pmol/mg prot) e LG ($21,6 \pm 0,7$ pmol/mg prot) ($p < 0,05$), sendo semelhante no resto da costa, com o mínimo em SG ($10,5 \pm 1,8$ pmol/mg prot).

A concentração média de Cit b₅ mantém-se inalterada, na maioria dos locais, do Inverno I ($15,4 \pm 5,6$ pmol/mg prot) para a Primavera ($15,7 \pm 5$ pmol/mg prot), mas diminui em LG e aumenta em OL. Assim, a variação espacial da concentração de Cit b₅ na Primavera apresenta um máximo em VM ($26,6 \pm 4,5$ pmol/mg prot) e OL ($21,3 \pm 1,4$

pmol/mg prot), que embora semelhantes entre si ($p>0,05$) são superiores à dos restantes locais.

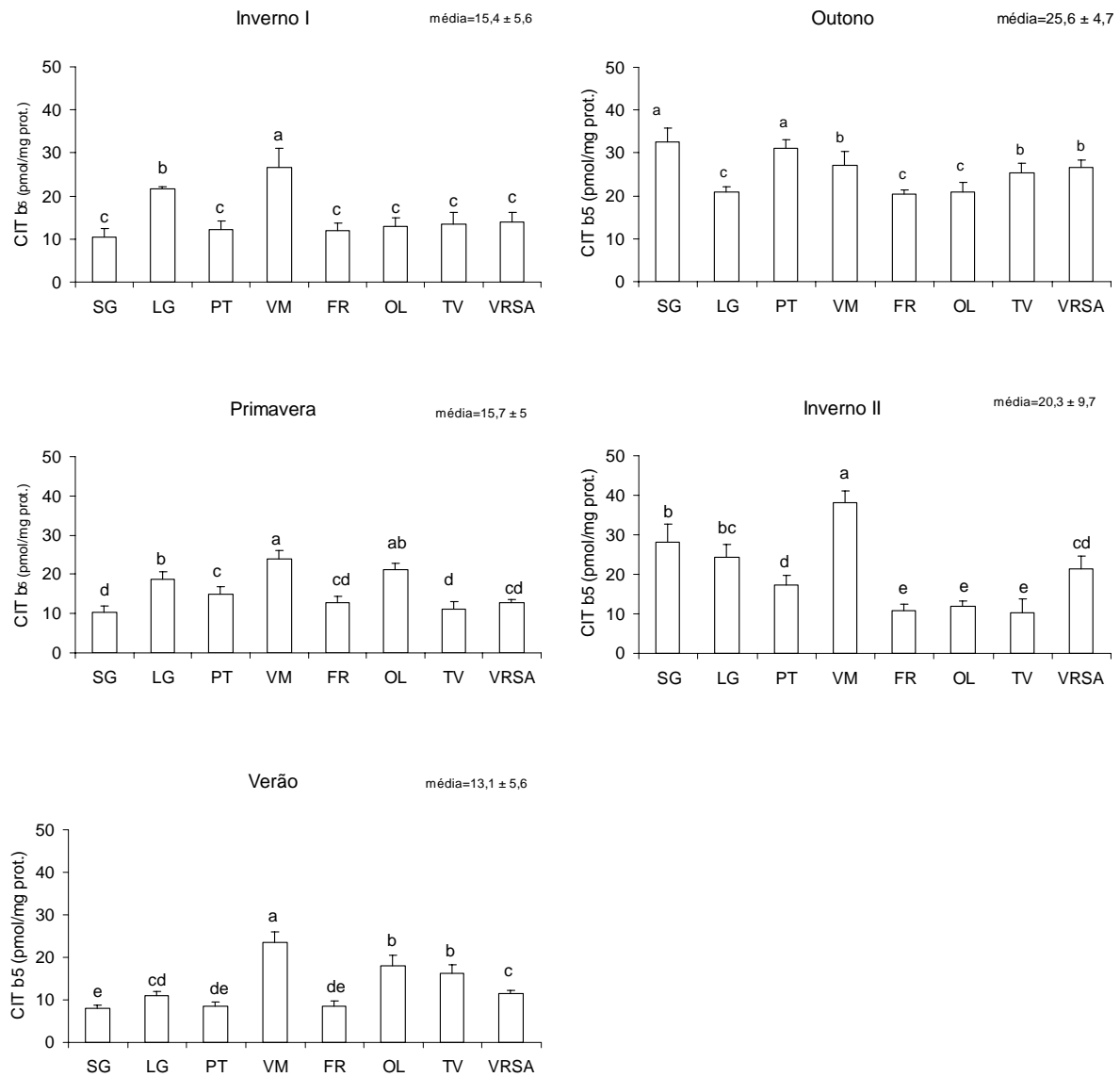


Figura 5.5 – Variação espacial da concentração total de citocromo b₅ (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes meses ao longo da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p<0,05$)

No Verão ($13,1\pm 5,6$ pmol/mg prot) houve uma diminuição generalizada da concentração de Cit b₅ em toda a costa, com excepção para VM onde a concentração deste citocromo ($23,4\pm 2,5$ pmol/mg prot) aumentou em relação ao mês anterior

($p < 0,05$), cujo valor foi o máximo nesta estação do ano. Em SG, PT e FR os valores de Cit b₅ são mínimos e oscilam entre $8 \pm 0,7$ (SG) e $8,5 \pm 1,2$ pmol/mg prot (FR) ($p < 0,05$). A concentração média de Cit b₅ no Outono ($25,6 \pm 4,7$ pmol/mg prot) é cerca do dobro da ocorrida no Verão sendo o máximo semelhante em SG ($32,7 \pm 3,1$ pmol/mg prot) e PT ($31,2 \pm 1,9$ pmol/mg prot) ($p > 0,05$).

VM, TV e VRSA têm concentrações de Cit b₅ que oscilam entre $25,3 \pm 2,2$ e $27 \pm 3,3$ pmol/mg prot ($p > 0,05$) e são superiores e significativamente diferentes às registadas em LG, FR e OL ($p < 0,05$). No Inverno II os teores de Cit b₅ mantêm-se elevados em SG, LG e VM, havendo um decréscimo acentuado em PT, FR, OL, TV relativamente ao Outono. Durante o Inverno II, a concentração máxima de Cit b₅ foi em VM ($38,1 \pm 3$ pmol/mg prot) e a mínima em TV ($10,3 \pm 3,5$ pmol/mg prot) ($p < 0,05$).

No que diz respeito à variação sazonal das concentrações de Cit b₅ nos mexilhões da costa Sul de Portugal analisados durante um ano consecutivo (Fig. 5.6), verificar-se que os valores são superiores em VM ($27,8 \pm 6$ pmol/mg prot), seguidos de LG ($19,4 \pm 5,1$) e SG, OL e VRSA (entre $17,0 \pm 4,4$ e $17,9 \pm 11,5$ pmol/mg prot, respectivamente), sendo mínimos em FR ($12,9 \pm 4,4$ pmol/mg prot). Em todos os locais a concentração é semelhante nos três primeiros meses, atingindo o máximo no Outono e Inverno II.

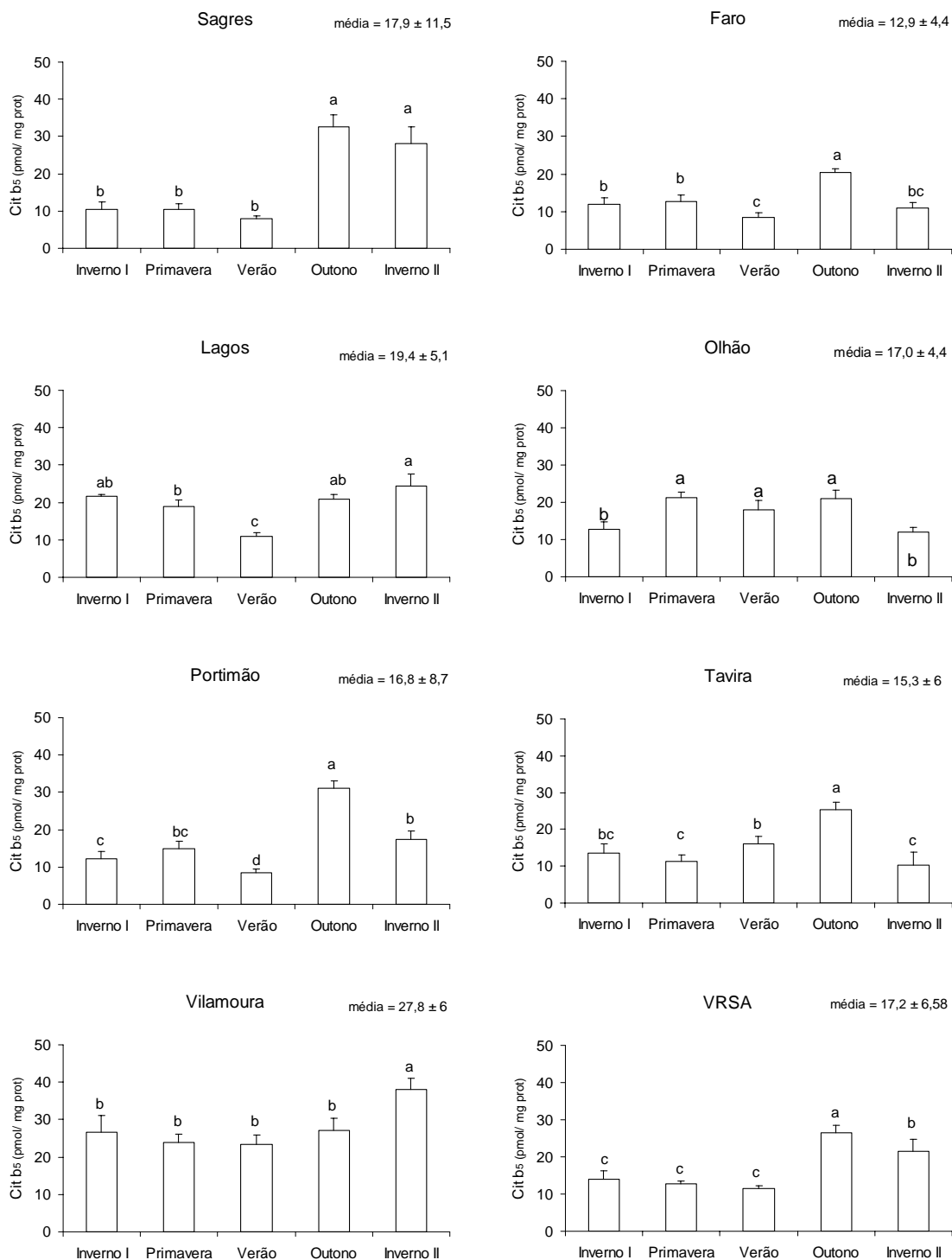


Figura 5.6 – Variação sazonal da concentração de citocromo b₅ (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

E – NADH-citocromo b₅-reductase (NADH-red)

Na Figura 5.7 e Tabela A3 (Anexo) estão representados os resultados da variação espacial da actividade da enzima NADH-red, analisada na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em oito locais da costa Sul de Portugal, durante um ano consecutivo.

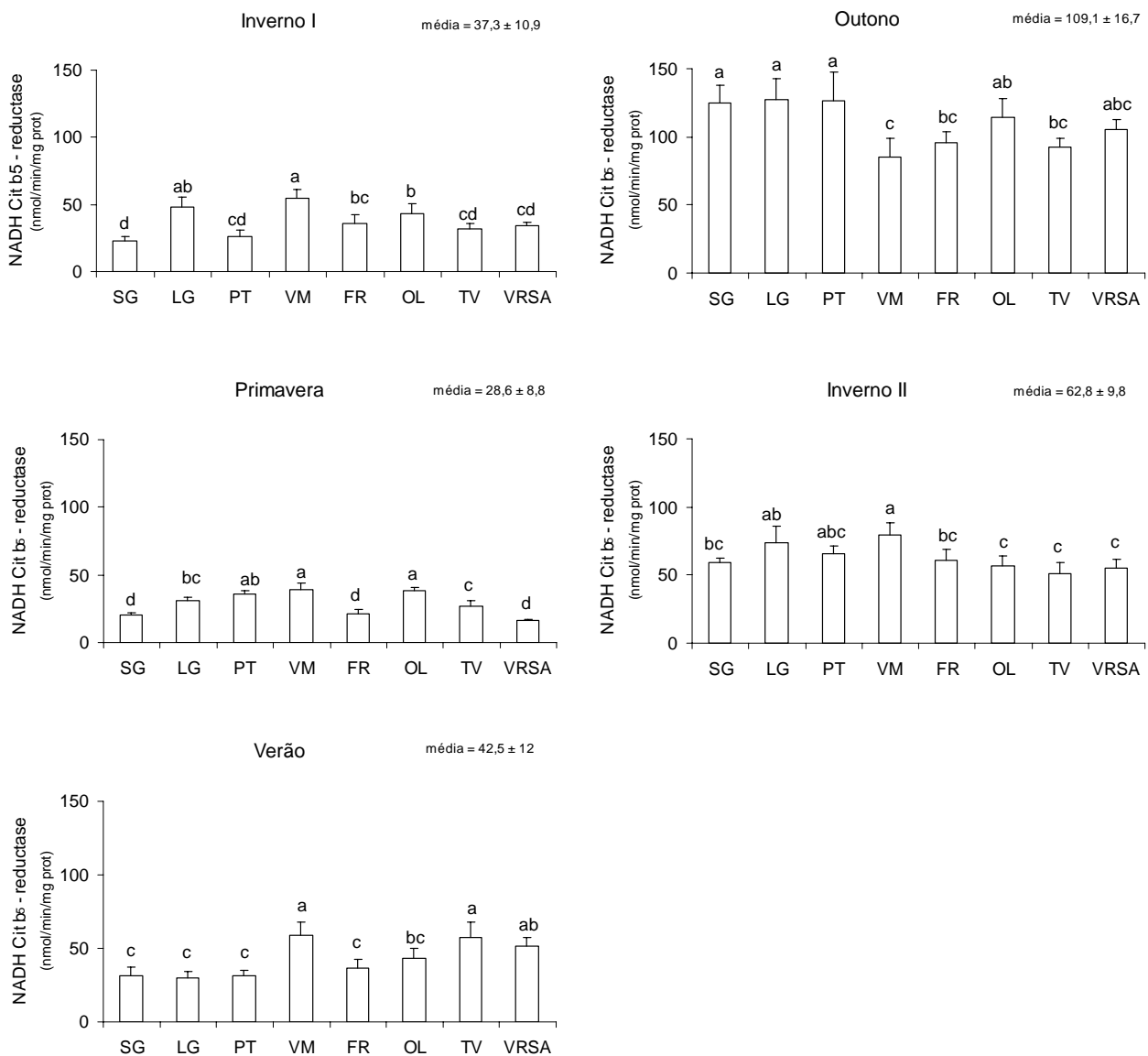


Figura 5.7 – Variação espacial da actividade da enzima NADH citocromo b₅ reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes estações do ano na costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

Espacialmente podemos verificar que no Inverno I ($37,3 \pm 10,9$ pmol/mg prot) a actividade média é semelhante em todos os locais, com o mínimo em SG ($23 \pm 3,3$ nmol/min/mg prot) e o máximo em VM ($54,9 \pm 6,1$ nmol/min/mg prot) ($p < 0,05$). Na Primavera ($28,6 \pm 8,8$ pmol/mg prot) a actividade da NADH-red é inferior à registada no Inverno I, sendo semelhante e mínima em SG, FR e VRSA (entre $16,3 \pm 1,2$ e $27,1 \pm 4,2$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$).

No Verão (média $42,5 \pm 12$ nmol/min/mg prot) a actividade é superior e significativamente semelhante em VM ($58,9 \pm 8,9$ nmol/min/mg prot), TV ($57,2 \pm 10,4$ nmol/min/mg prot) e VRSA ($51,8 \pm 5,6$ nmol/min/mg prot) ($p < 0,05$) e mínima em SG, LG e PT (entre $30,0 \pm 7,8$ e $31,7 \pm 6,8$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$). No Outono, regista-se a maior actividade da NADH-red durante o ano (valor médio $109,1 \pm 16,7$ nmol/min/mg prot), e tal como no Verão, semelhante entre SG, LG e PT ($125,2 \pm 12,8$ e $127,2 \pm 16$ nmol/min/mg prot; $p > 0,05$) mas contrariamente ao Verão, a actividade é máxima ($p < 0,05$). Nos restantes locais a actividade da enzima é semelhante, sendo a menor actividade nos mexilhões de VM ($85,4 \pm 13,3$ nmol/min/mg prot). No Inverno II há um decréscimo generalizado da actividade da enzima NADH-red, relativamente ao Outono, mas os valores são superiores aos do Inverno I, Primavera e Verão ($p < 0,05$). A variação espacial da actividade ao longo da costa no Inverno II, não parece ter um padrão definido, sendo semelhante em todos os locais estudados, com actividades mínimas ($p < 0,05$) em OL, TV e VRSA, cujos valores variam entre $50,9 \pm 8,2$ e $56,5 \pm 7,9$ nmol/min/mg prot ($p > 0,05$), e máximos em LG, PT e VM, oscilando entre $66 \pm 5,4$ e $79,7 \pm 8,8$ nmol/min/mg prot ($p > 0,05$).

A variação sazonal da actividade da enzima NADH-red (Fig. 5.8) nos oito locais estudados acompanha a distribuição sazonal da concentração do citocromo b_5 , ou seja, as actividades são crescentes do Inverno I até ao Outono, decrescendo para o Inverno II,

que no entanto apresenta valores da actividade superiores aos ocorridos nos primeiros três meses.

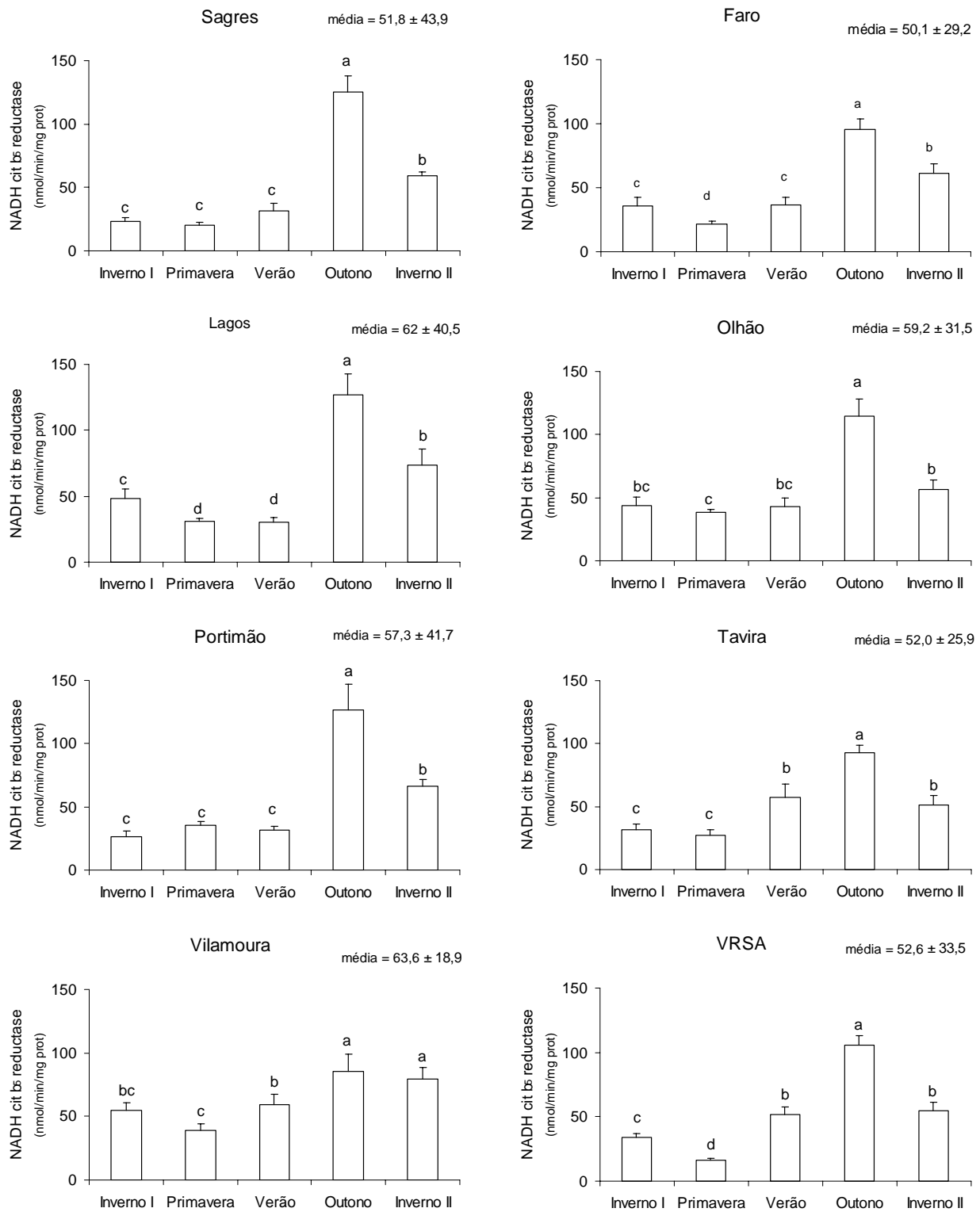


Figura 5.8 – Variação sazonal da actividade da enzima NADH citocromo b₅ reductase (média ± desvio padrão) (nmol/min/mg prot) na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis*, recolhidos em diferentes locais da costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$)

A actividade média mensal desta enzima é semelhante em toda a costa, oscilando entre $50,1 \pm 29,4$ e $63,6 \pm 18,9$ nmol/min/mg prot em FR e VM, respectivamente.

Para avaliar as diferenças sazonais e espaciais da distribuição da concentração e actividade dos componentes do sistema MFO, foi aplicada a análise dos componentes principais (PCA) aos dados, cujos resultados se apresentam na Figura 5.9. Os eixos 1 e 2 representam em conjunto 98% da variância dos dados. Como se pode verificar existem diferenças sazonais (Fig. 5.9 - cores) na variação da concentração e da actividade dos componentes do sistema MFO, na medida em que o eixo 1 agrupa na zona negativa os dados relativos ao Inverno I, Primavera e Verão, e na zona positiva o Outono e o Inverno II, associados ao aumento da concentração e actividade quer dos citocromos quer das reductases. Por outro lado, estes dois períodos são separados pelo eixo 2, estando as amostras de Outono projectadas na zona negativa e mais relacionados com a NADH-red e o citocromo b_5 enquanto que os Invernos I e II são projectados na zona positiva do eixo 2, relacionando-se com o CYP450. O mesmo padrão sazonal (isto é, Inverno I, Primavera e Verão semelhantes (mas ligeiramente superiores no Inverno I), com concentrações e actividades crescentes para o Outono e Inverno II) foi verificado anteriormente nas Figuras 5.2, 5.4, 5.6 e 5.8.

A análise PCA aplicada aos componentes do sistema MFO mostra ainda a associação espacial (Fig. 5.9 - números) entre VM e OL na zona positiva do eixo 2, excepto OL no Outono devido ao aumento da actividade da NADH-red, enquanto que na zona negativa do eixo 2 são agrupados os restantes locais. Estes, por sua vez indicam uma separação entre meses, destacando-se o Outono no quadrante inferior direito, que apresentou a maior actividade da NADH-red registada.

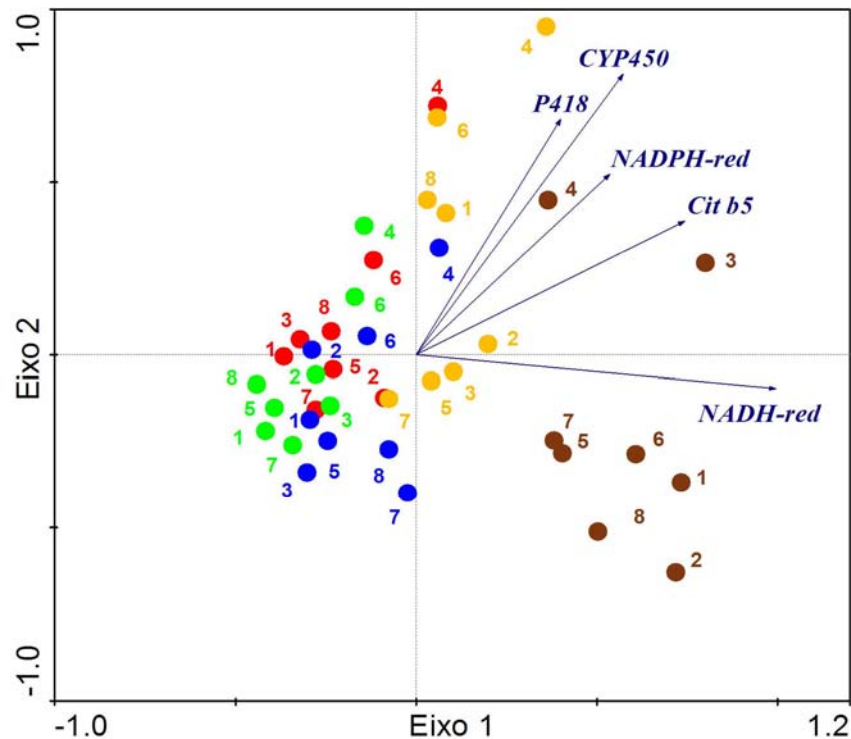


Figura 5.9 - Análise de Componentes Principais (PCA) do sistema MFO (vectores) na glândula digestiva dos mexilhões *M. galloprovincialis*, indicando os *scores* legendados por mês (cores), e legendados por local (números). (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; 1 - SG; 2 - Lagos; 3 - Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

F - Relação entre os componentes do sistema MFO

De modo a estudar as relações entre os componentes do sistema dependente do CYP450, foi aplicada a análise de regressão aos dados, quer na sua totalidade quer separados por meses. A análise de regressão múltipla efectuada revela que o CYP450 está directamente relacionado com os restantes componentes do sistema MFO, segundo a equação $CYP450 = 1,93 + 2,53 P418 + 1,32 NADPH-red + 0,44 Cit b_5 + 0,02 NADH-red$ ($r = 0,84$; $p < 0,05$), sendo estatisticamente significativa para o P418 e NADPH-red ($p < 0,05$) (indicando que a variação espacial e sazonal é semelhante e dependente), mas não para o citocromo b_5 e NADH-red ($p > 0,05$) (indicando que estes têm uma variação

espacial e sazonal diferente do CYP450 e portanto menos dependente). Quando se analisa a relação entre o CYP450 com os restantes componentes do sistema MFO individualmente (Fig. 5.10) verifica-se também uma relação linear significativa entre o CYP450 e o P418 ($r = 0,76$), a NADPH-red ($r = 0,73$) e o citocromo b_5 ($r = 0,68$) ($p < 0,05$) (Tabela 5.1). Por outro lado, existe também uma relação positiva e significativa entre o citocromo b_5 e a respectiva reductase (NADH-red) ($r = 0,69$; $p < 0,05$).

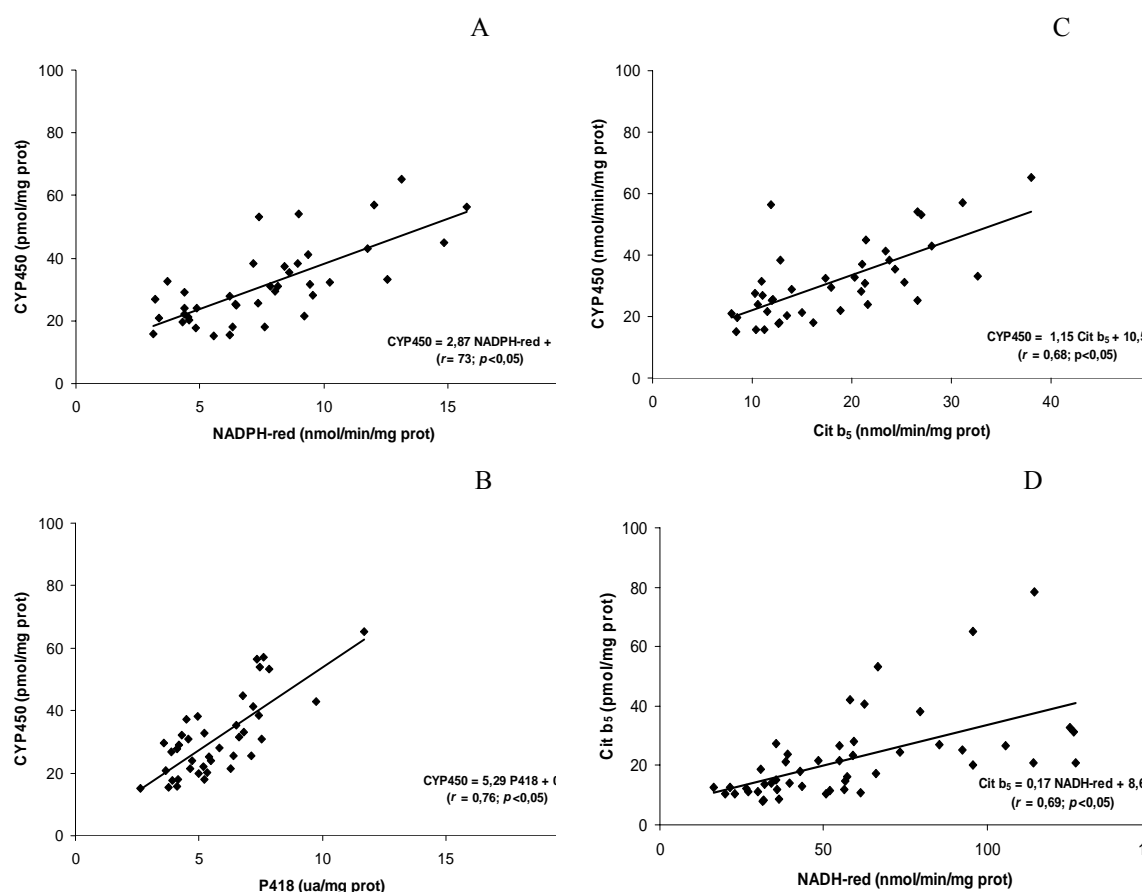


Figura 5.10 – Relação entre o CYP450 e a NADPH-red (A), o pico “418” (B) e o Cit b_5 (C) e entre o citocromo b_5 e a NADH-red (D), considerando todo o conjunto de dados (período anual).

Tabela 5.1 - Relação entre a concentração total de CYP450 e a actividade da NADPH-cit *c*-reductase, e entre a concentração total de Cit b₅ e a actividade da NADH-citocromo b₅-reductase na glândula digestiva de *M. galloprovincialis*, por estação do ano (*: $p < 0,05$)

Mês	Equação	<i>r</i>	Equação	<i>r</i>
Inverno I	$CYP450 = 4,36 \text{ NADPH} + 2,88$	0,78*	$Cit b_5 = 0,45 \text{ NADH} - 1,4$	0,87*
Primavera	$CYP450 = 2,47 \text{ NADPH} + 8,26$	0,53	$Cit b_5 = 0,47 \text{ NADH} + 2,3$	0,82*
Verão	$CYP450 = 1,62 \text{ NADPH} + 14,1$	0,49	$Cit b_5 = 0,36 \text{ NADH} - 2,2$	0,78*
Outono	$CYP450 = 1,26 \text{ NADPH} + 26,4$	0,32	$Cit b_5 = 0,07 \text{ NADH} + 17,5$	0,26
Inverno II	$CYP450 = 3,22 \text{ NADPH} + 5,81$	0,79*	$Cit b_5 = 0,73 \text{ NADH} - 25,4$	0,73*

A actividade da NADPH-red aumenta com o aumento do CYP450 em todas as estações do ano, sendo a relação significativa apenas nos Inverno I, II (Tabela 5.1). No que diz respeito à relação entre o citocromo b₅ e a respectiva reductase NADH-red, esta é significativa e com declives semelhantes nos Invernos I e II, Primavera e Verão, enquanto que no Outono, tal como para o CYP450, a relação, embora crescente, não é significativa ($p > 0,05$) (Tab. 5.1).

5.3.2- Distribuição Temporal

A - Citocromo P450 e NADPH-citocromo *c* reductase

Os resultados do estudo temporal relativos à concentração total de CYP450 (pmol/mg prot) e à actividade da NADPH-red (nmol/min/mg prot) analisado na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos na costa Algarvia, durante três situações de Inverno, encontram-se na Fig. 5.11 e Tabela A3 (Anexo).

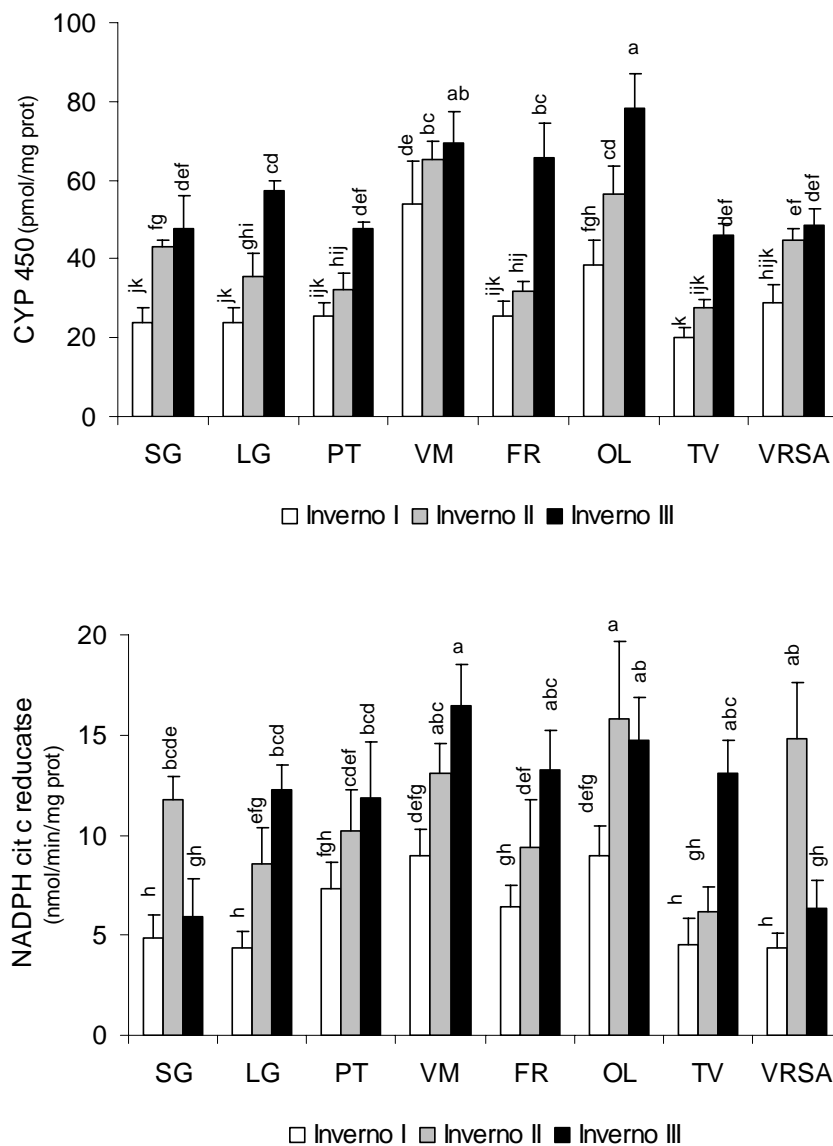


Figura 5.11 - Variação da concentração total de CYP450 (média \pm desvio padrão) (pmol/mg prot) e da actividade da NADPH-cit c-reductase (nmol/min/mg prot) em três situações de Inverno, na glândula digestiva de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da Costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas $p < 0,05$).

O pico P418 representa entre 13 a 21% da concentração total de CYP450 e tem o mesmo padrão espacial de distribuição dos Invernos anteriores, mostrando que este pico resulta da degradação do CYP450. Tal como referido anteriormente (ponto 5.3.1), a

concentração total de CYP450 aumenta do Inverno I para o III, onde se atinge o máximo ($p < 0,05$), para todos os locais, sendo o Inverno I significativamente diferente dos Invernos seguintes. Embora haja um aumento progressivo da concentração total do CYP450 do Inverno II para o III, este aumento não é significativo em SG, VM, e VRSA ($p < 0,05$). De um modo geral e durante um período de seis anos, a concentração de CYP450 aumentou em toda a costa Sul de Portugal em média 48%.

Quanto à actividade da CYP450 reductase (NADPH-red), verifica-se que à medida que a concentração do CYP450 aumenta, a sua reductase também aumenta do Inverno I para o III. No entanto, SG, OL e VRSA registam um decréscimo do Inverno II para o III, não atingindo a actividade do Inverno I. Em SG e VRSA a diminuição é acentuada e significativamente diferente entre o Inverno II e III ($p < 0,05$), enquanto que em OL a diminuição da actividade da NADPH-red não é significativa ($p > 0,05$). Contudo, especialmente a actividade da NADPH-red aumentou em seis anos entre 17% (SG) e 65% (TV), apresentando um aumento médio em toda a costa de 44%.

B - Citocromo b₅ e NADH-citocromo b₅ reductase

A concentração total de Cit b₅ e a actividade da enzima NADH-red analisadas na glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* no estudo temporal, está representada na Figura 5.12 e Tabela A3 (Anexo). A concentração de Cit b₅ aumenta do Inverno I para o II na maioria dos locais, sendo esse aumento significativo em SG, PT, VM e VRSA ($p < 0,05$) enquanto que em LG, FR, OL e TV não há diferenças significativas ($p > 0,05$). A concentração de Cit b₅ é superior no Inverno III em relação aos anteriores ($p < 0,05$) na maioria dos locais, excepto em SG e VRSA.

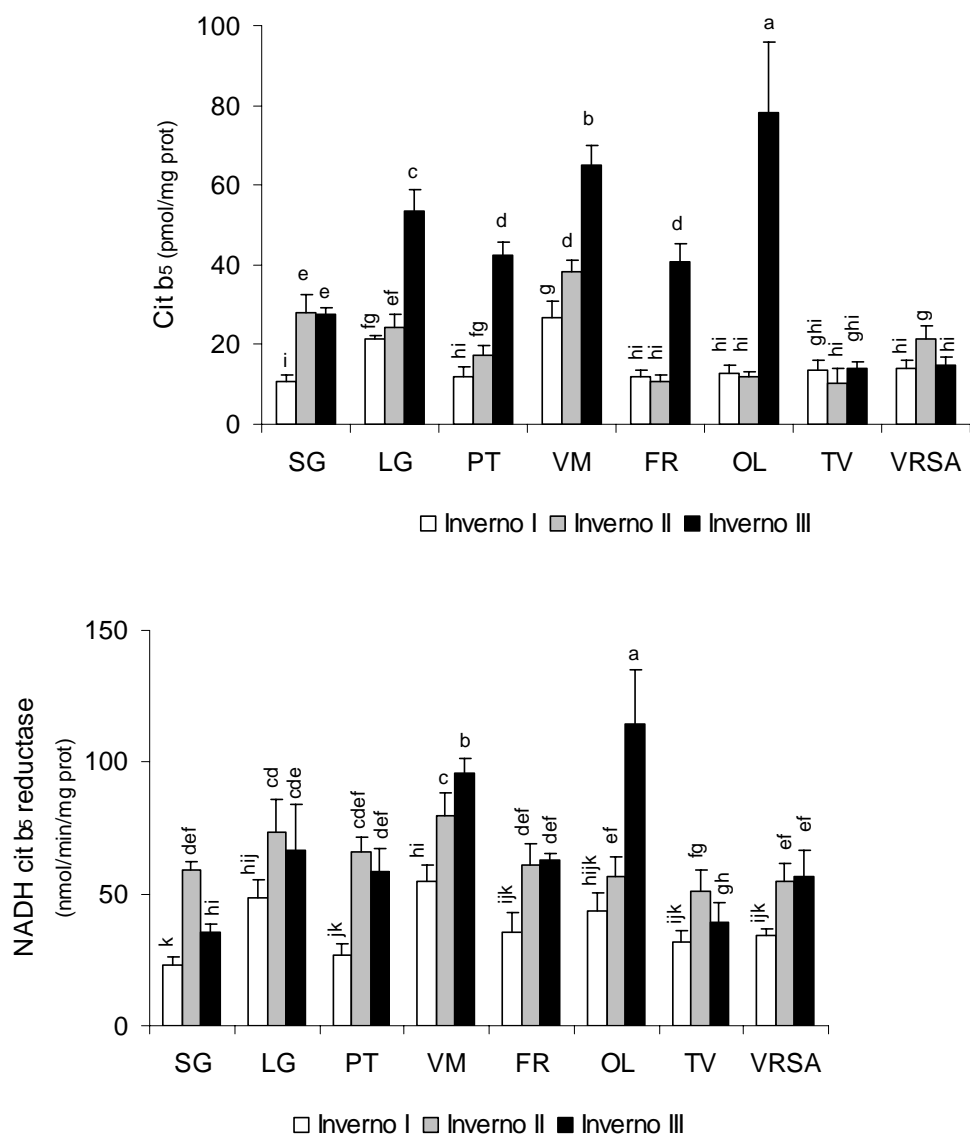


Figura 5.12 - Variação da concentração total de citocromo b₅ (média ± desvio padrão) (pmol/mg prot), e da actividade da NADH-citocromo b₅-reductase (nmol/min/mg prot) em três situações de Inverno, na glândula digestiva de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da Costa Sul de Portugal. (letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$).

Em SG a concentração de Cit b₅ é semelhante entre o Inverno II e III, enquanto que em VRSA a concentração decresceu no mesmo período, atingindo níveis semelhantes aos detectados no Inverno I. Apesar desta variação, regista-se um aumento médio da concentração de citocromo b₅ (51,9%) em toda a costa no período de seis anos, sendo

superior em OL (84%) e inferior em TV e VRSA (4,3 e 4,9 %, respectivamente), onde a concentração de citocromo b₅ não variou durante o período temporal.

Relativamente à evolução temporal da enzima NADH-red na glândula digestiva dos mexilhões, observa-se que a actividade desta enzima também aumenta ao longo do tempo, atingindo o máximo no Inverno III na maioria dos locais, embora a distribuição espacial nem sempre acompanhe a distribuição espacial do citocromo b₅. A actividade desta enzima no Inverno I é significativamente diferente da dos Invernos II e III, para a maioria dos locais, enquanto que entre o Inverno II e o III as diferenças só são significativas em SG (decréscimo), VM e OL (aumento). No entanto, ao longo do período temporal verificou-se um aumento médio da actividade da enzima NADH-red do Inverno I para o Inverno III (40%), com o incremento máximo em OL (62%) e mínimo em TV (19%).

A análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados temporais dos componentes do sistema MFO, de modo a melhor avaliar a diferença sazonal e espacial da sua distribuição (Figura 5.13). Os eixos 1 e 2 representam em conjunto 94% da variância dos dados, confirmando que a distribuição dos componentes do sistema MFO no Inverno I é diferente dos Invernos seguintes, estando projectado na parte negativa do eixo 1 e oposto à projecção dos citocromos e reductases, reflectindo a menor concentração e actividade dos componentes do sistema MFO neste mês. Por outro lado o eixo 2 separa na zona positiva a maioria dos locais do Inverno II e na zona negativa o Inverno III, evidenciando também as diferenças entre estes Invernos. Espacialmente verifica-se uma proximidade entre VM e OL que de um modo geral apresentam as maiores concentrações e actividades dos componentes do sistema MFO.

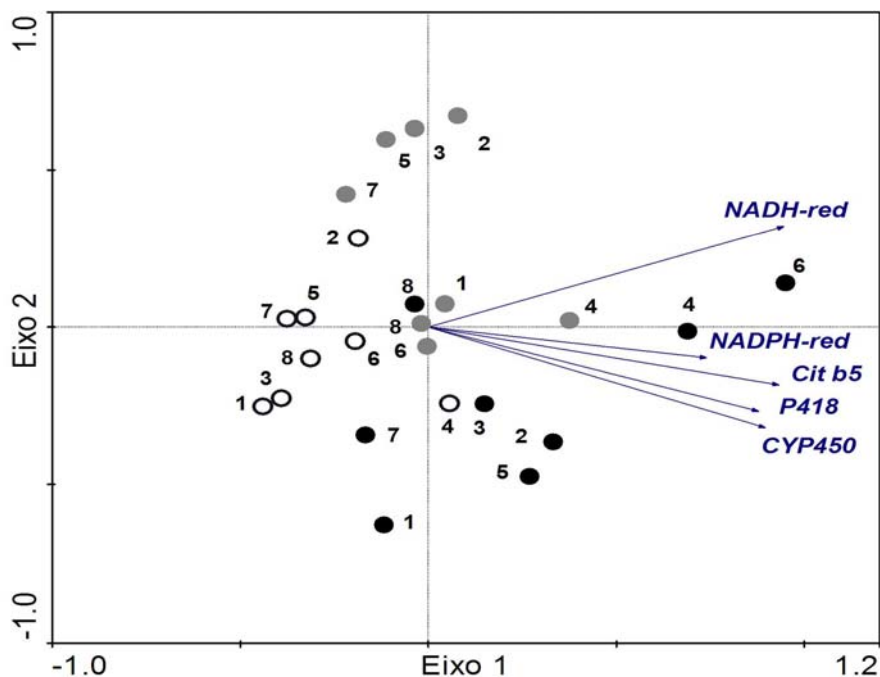


Figura 5.13 – Análise dos componentes principais (PCA) dos componentes do sistema MFO (vectors) na glândula digestiva dos mexilhões *M. galloprovincialis*, no período temporal, indicando os *scores* legendados por mês e local. (o-: Inverno I; ◐-Inverno II; ●:- Inverno III; 1 - Sagres; 2 - Lagos; 3 – Portimão; 4 - Vilamoura; 5 - Faro; 6 - Olhão; 7 - Tavira; 8 - Vila Real de Santo António).

C - Relação entre os componentes do sistema MFO

A relação temporal entre o CYP450 e os restantes componentes do sistema dependente do CYP450 foi estudada pela análise de regressão, aplicada aos dados quer na sua totalidade, quer separado por Invernos. A análise de regressão múltipla efectuada com os dados dos três Invernos, revela que o CYP450 se relaciona positivamente com os restantes componentes do sistema MFO, segundo a equação $CYP450 = 7,41 + 1,33 P418 + 1,53 NADPH-red + 0,24 Cit b_5 + 0,07 NADH-red$ ($r = 0,89$), não sendo no entanto significativa para qualquer dos citocromos ou reductases ($p > 0,05$), indicando que existem diferenças espaciais nos três Invernos. No entanto, quando se avalia a relação temporal entre o CYP450 e cada um dos componentes do sistema MFO em separado (Fig. 5.14), as relações são positivas e significativas, quer entre o CYP450 e a

NADPH-red ($r = 0,79$) e o P418 ($r = 0,85$), assim como entre o CYP450 e Cit b₅ ($r = 0,80$). À medida que o citocromo b₅ aumenta também aumenta a actividade da sua reductase NADH-red ($r = 0,81$).

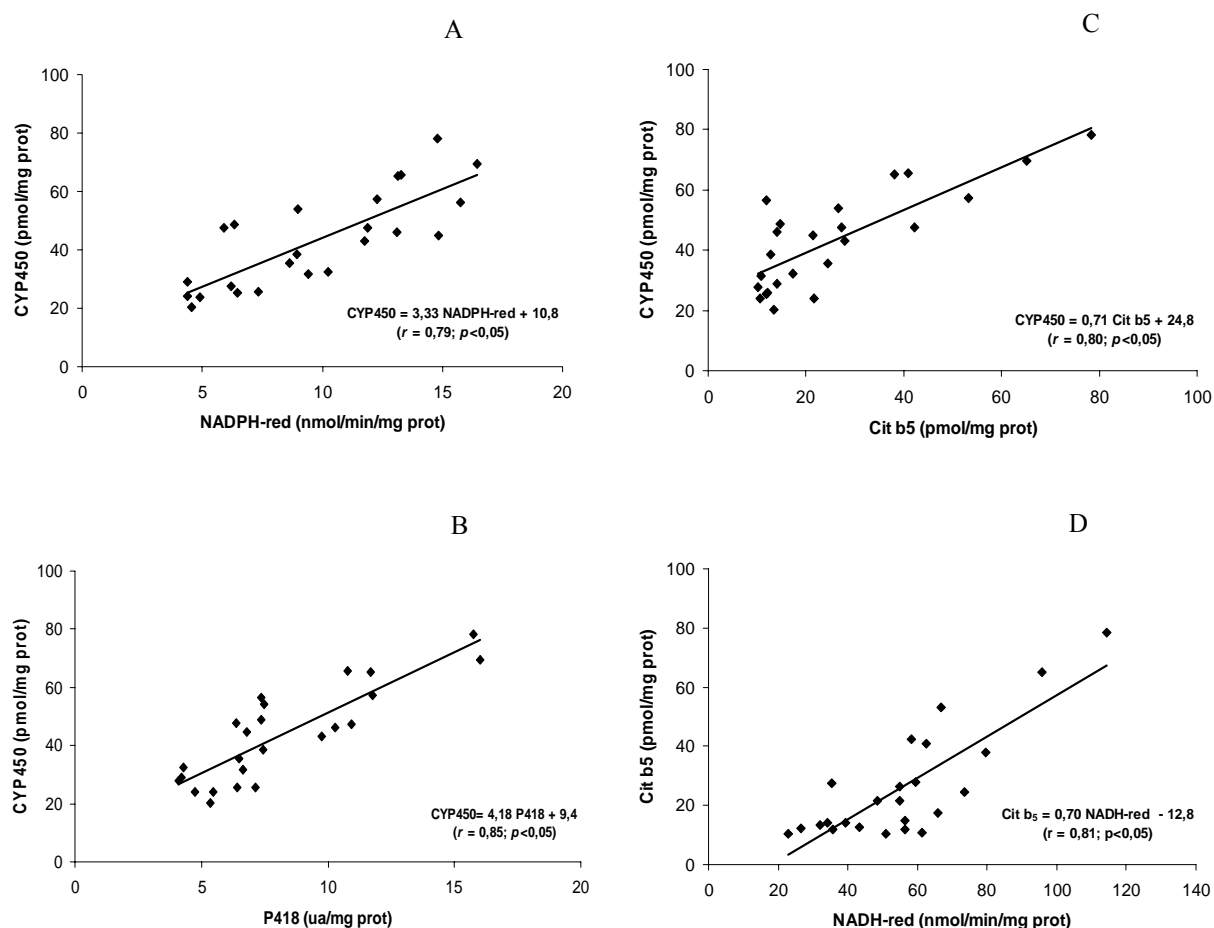


Figura 5.14 – Relação entre o CYP450 e a NADPH-red (A), o pico “418” (B) e o Cit b₅ (C) e entre o citocromo b₅ e a NADH-red (D), considerando os dados dos três Invernos (período temporal).

Tabela 5.2 - Relação entre a concentração total de CYP450 e a actividade da NADPH-cit c-reductase, e entre a concentração total de Cit b₅ e a actividade da NADH-citocromo b₅-reductase na glândula digestiva de *M. galloprovincialis*, no Inverno I, II e III (*: $p < 0,05$).

Mês	Equação	r	Equação	r
Inverno I	$CYP450 = 4,36 \text{ NADPH} + 2,9$	0,78*	$Cit \text{ b}_5 = 0,45 \text{ NADH} - 1,4$	0,87*
Inverno II	$CYP450 = 3,22 \text{ NADPH} + 5,2$	0,79*	$Cit \text{ b}_5 = 0,73 \text{ NADH} - 25,4$	0,73*
Inverno III	$CYP450 = 2,22 \text{ NADPH} + 31,5$	0,69	$Cit \text{ b}_5 = 0,78 \text{ NADH} - 9,4$	0,90*

Durante cada um dos três Invernos (Tab. 5.2) também a actividade da enzima NADPH-red aumenta com o aumento da concentração total de CYP450, cujos declives decrescem do Inverno I para o II e III, sendo a regressão significativa apenas nos dois primeiros Invernos, indicando que não há diferenças espaciais. A relação entre o citocromo b₅ e a enzima NADH-red em cada um dos três Invernos segue a mesma tendência que nos casos anteriores, ou seja, o aumento da concentração de citocromo b₅ é acompanhado pelo aumento da actividade da NADH-red, sendo significativo para as três situações. Os declives da recta aumentam do Inverno I para o II, sendo idênticos entre o Inverno II e o Inverno III.

5.3.3- Relação entre o CYP450 e os hidrocarbonetos

A toxicidade dos *n*-alcanos e os seus efeitos no sistema sistema MFO não foi encontrada em nenhum estudo prévio, embora os *n*-alcanos tenham sido referenciados como tendo pouco impacto nas funções fisiológicas, como a taxa de filtração (Thomas *et al.*, 1995), tendo-se também verificado uma aumento da actividade da NADPH-red com os TAlc ($r = 0,71$; Solé *et al.*, 1996). Por outro lado, vários autores referem aumento das concentrações e actividades dos componentes do sistema MFO com o aumento das concentrações de PAHs, quer em trabalhos de campo (Michel *et al.*, 1994; Livingstone *et al.*, 1995; Porte *et al.*, 1991; Solé *et al.*, 1995 a,b; Porte *et al.*, 1999), após derrames de petróleo (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000b), ou exposição laboratorial (Livingstone, 1988; Michel *et al.*, 1993).

A relação entre o citocromo P450, analisado na glândula digestiva, e a concentração de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) acumulados nos tecidos dos mexilhões (Cap.3

e 4), foi avaliada pela análise de regressão, quer com a totalidade dos dados, quer mensalmente.

Na Tabela 5.3 apresenta-se as relações obtidas entre o CYP450 e a concentração de TAlc e de UCM, indicando uma relação positiva ($p < 0,05$) quando se analisa todo o conjunto de dados ($r = 0,63$ e $0,40$, respectivamente). Relativamente às diferentes estações do ano, esta relação não é significativa na Primavera nem no Inverno II (TAlc e UCM) e no Inverno III (TAlc).

Tabela 5.3 – Relação entre a concentração total de CYP450 e a concentração total de TAlc e UCM, em mexilhões *M. galloprovincialis* da costa Sul de Portugal.

Mês	TAlc		UCM	
	Equação	<i>r</i>	Equação	<i>r</i>
Inverno I	$CYP450 = 1,26 \text{ TAlc} + 25,6$	0,63*	$CYP450 = 0,04 \text{ UCM} + 30,1$	0,40*
	$CYP450 = 1,26 \text{ TAlc} + 18,8$	0,87*	$CYP450 = 0,07 \text{ UCM} + 16,3$	0,96*
Primavera	$CYP450 = 1,98 \text{ TAlc} + 14,9$	0,41	$CYP450 = 0,07 \text{ UCM} + 17,1$	0,25
Verão	$CYP450 = 1,64 \text{ TAlc} + 17,6$	0,65*	$CYP450 = 0,08 \text{ UCM} + 18,4$	0,67*
Outono	$CYP450 = 1,58 \text{ TAlc} + 25,4$	0,75*	$CYP450 = 0,06 \text{ UCM} + 28,1$	0,77*
Inverno II	$CYP450 = 0,50 \text{ TAlc} + 30,8$	0,44	$CYP450 = 0,02 \text{ UCM} + 38,6$	0,44
Inverno III	$CYP450 = 0,41 \text{ TAlc} + 51,4$	0,33	$CYP450 = 0,17 \text{ UCM} + 40,2$	0,79*

Quanto aos hidrocarbonetos aromáticos, os resultados mostram que existe uma relação linear positiva entre o CYP450 e a concentração de TPAH quando se analisa todo o conjunto de dados ($r = 0,34$; $p < 0,05$) (Fig. 5.15 A), e quando os dados são tratados separadamente, excepto na Primavera (Fig. 5.15 B).

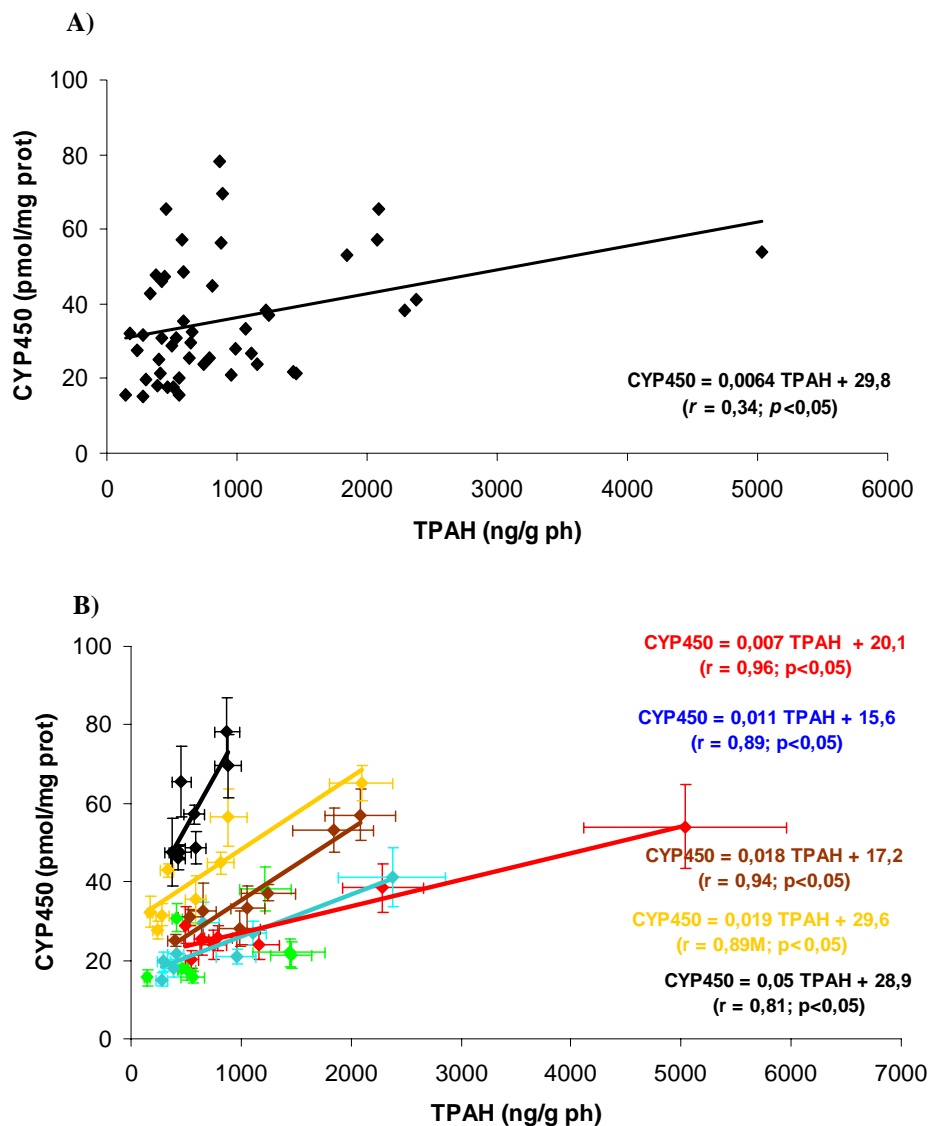


Figura 5.15 – Relação entre a concentração total de CYP450 e a concentração de TPAH, considerando todo o conjunto de dados (A) e mensalmente (B) (●-: Inverno I; ●-: Primavera; ●-: Verão; ●-: Outono; ●-: Inverno II; ●-: Inverno III)

Quando se analisa a relação entre o CYP450 e os TPAH separados por estações do ano (Fig. 5.15 B), existe uma relação linear significativa em todos os meses, excepto na Primavera, o que indica semelhanças espaciais na distribuição das variáveis. Especialmente os locais onde se observam as concentrações mais elevadas de TPAH - VM e OL – são também os locais onde se verificam as concentrações e actividades mais

elevadas dos componentes do sistema MFO. A análise da relação entre o CYP450 e os PAHs totais mostra ainda que os declives da recta aumentam com a estação do ano, indicando que a resposta do CYP450 é mais rápida nos Invernos II e III do que no Inverno I.

De modo a avaliar qual dos hidrocarbonetos individuais (*n*-alcanos e PAHs) tem mais influência na concentração e actividades dos componentes do sistema MFO, utilizou-se a análise canónica, na qual os hidrocarbonetos individuais são expressos em termos de proporção da concentração total, utilizando-se a globalidade dos dados (distribuição anual e temporal). Numa primeira abordagem foram usados os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em separado (Fig. 5.16 A e 5.16 B), e noutra os dados são usados em simultâneo (Fig. 5.16 C). No primeiro caso (eixo 1 e 2 explicam 87% da variância dos dados), os *n*-alcanos de elevado peso molecular (C24-C36) (eixo +1) são os que estão mais relacionados com o sistema MFO, em oposição aos isoprenoides e *n*-alcanos de peso molecular menor (C14-C23), que se projectam no eixo (-1). Quando se analisa só os PAHs individuais (eixos 1 e 2 explicam 40% da variância) (Fig. 5.16B), os PAHs pirolíticos de 5 anéis (BaP, BkF e DahA) e 6 anéis (IndP e BPer) são os que se relacionam mais como sistema MFO, embora os PAHs petrogénicos de menor peso molecular (N, Flr, Fen, Ant) também tenham alguma influência, pois também estão projectados na parte positiva do eixo 1, mas opostos aos anteriores (eixo-2). Quando se analisam os hidrocarbonetos em simultâneo (Fig. 5.16 C) (os eixos 1 e 2 explicam 62% da variância dos dados), verifica-se que a projecção dos *n*-alcanos se mantém idêntica, enquanto que os PAHs petrogénicos (N, Flr, Fen, Ant) se agrupam no eixo (+2) em conjunto com os pirolíticos de elevado peso molecular, mas afastados destes. Neste caso os PAHs são agrupados e separados dos *n*-alcanos, elucidando as diferenças estruturais

das moléculas (ausência/presença do anel de benzeno), sendo que os compostos que se relacionam com o sistema MFO são principalmente os *n*-alcanos de elevado peso molecular (C24 a C36) (eixo -2) e os PAHs pirolíticos de 5 e 6 anéis (eixo+2), tal como verificado anteriormente nas análises individuais.

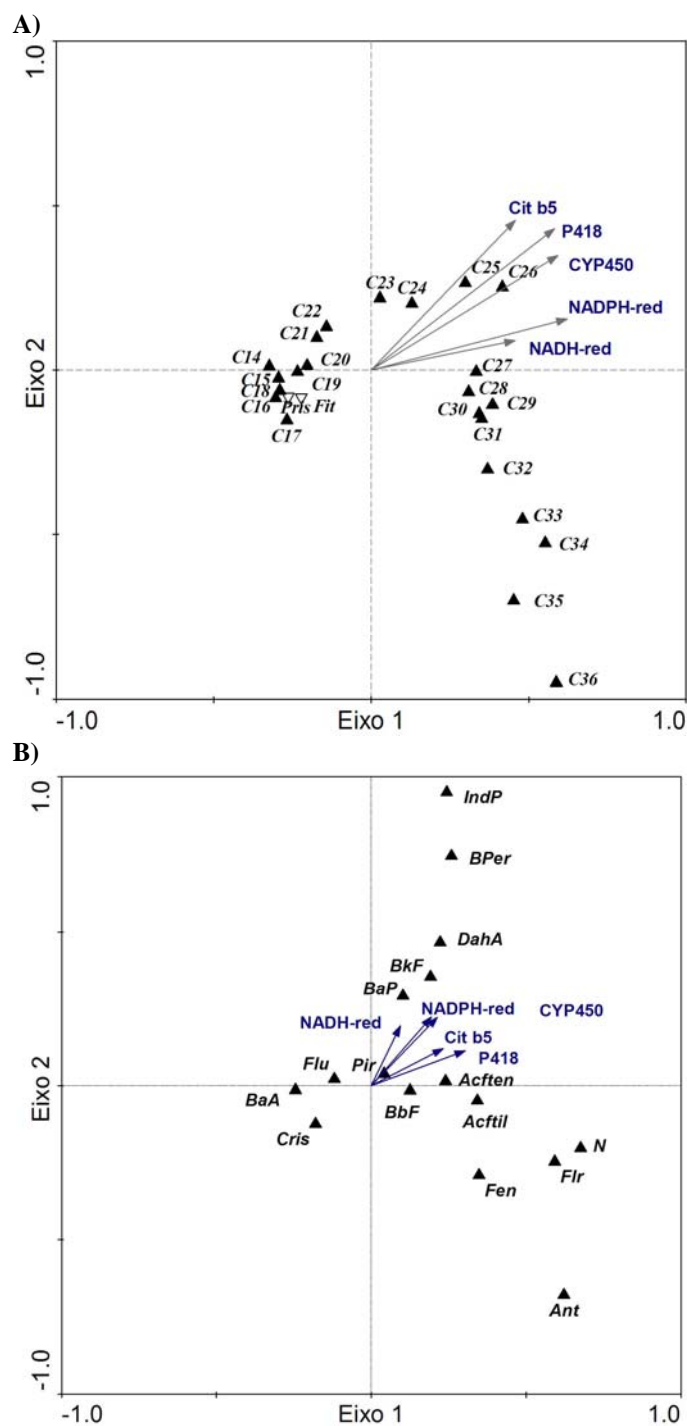


Figura 5.16 – Análise Canônica (CA) entre os componentes do sistema MFO e a concentração de TAlc (A), de TPAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando todos os meses em estudo. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 3.2 e 4.1).

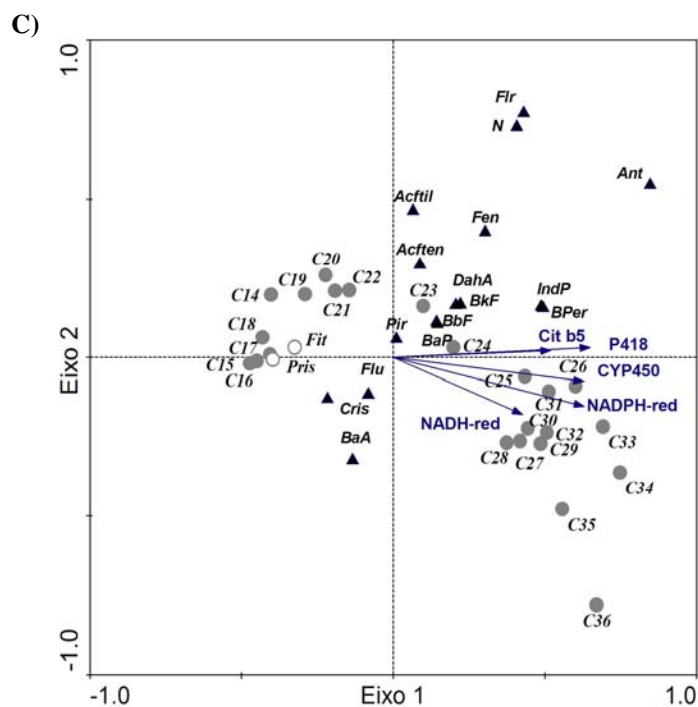


Figura 5.16 (Continuação) – Análise Canônica (CA) entre os componentes do sistema MFO e a concentração de TAIs (A), de TPAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando todos os meses em estudo. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 3.2 e 4.1).

5.4 – DISCUSSÃO

O primeiro passo no metabolismo de muitos compostos orgânicos é mediado pelo sistema oxigenase de função mista (mixed-function oxygenase system – MFO) ou sistema dependente do citocromo P450 (Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 2001; Solé *et al.*, 2007). Os mexilhões são bivalves filtradores usados amplamente na avaliação da qualidade ambiental, devido à sua capacidade em acumular poluentes nos seus tecidos (Livingstone, 1987). Além disso, os mexilhões, apesar do seu baixo metabolismo relativamente aos peixes, respondem aos compostos petrogênicos através de alterações no sistema MFO, ou de alterações de enzimas de conjugação e na resposta antioxidante

(Livingstone, 2001). A análise química dos contaminantes alvo associada à análise de biomarcadores de exposição/efeito, tem sido recomendado em estudos de monitorização ambiental (Cajaraville *et al.*, 2000) e foi aplicada tanto em estudos de campo (Solé, 2000; Porte *et al.*, 2001 a; Bebianno *et al.*, 2007; Serafim *et al.*, 2008) como após derrames de petróleo (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000b; Moreira *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008) nomeadamente do impacto do *Prestige* na costa da Galiza em 2002 (Coimbra *et al.*, 2004; Pérez-Cadahía *et al.*, 2004; Marigómez *et al.*, 2006; Martinez-Gómez *et al.*, 2006; Solé *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008).

Este Capítulo pretende avaliar a capacidade de resposta dos vários componentes do sistema MFO (CYP450, Citocromo b₅ e reductases) resultantes da acumulação de produtos do petróleo em mexilhões na costa Sul de Portugal.

A concentração total de CYP450 na fracção microsomal da glândula digestiva dos mexilhões da costa Sul de Portugal (entre 15,1 e 69,6 pmol/mg prot) é da mesma ordem de grandeza das determinadas por em mexilhões recolhidos na mesma zona (Bebianno *et al.*, 2007; Lopes e Bebianno, 2007; Serafim *et al.*, 2008), assim como no Mar do Norte (17-43 pmol/mg prot) (Solé, 2000 a) ou na Lagoa de Veneza (23-57 pmol/mg prot) (Livingstone *et al.*, 1995; Solé *et al.*, 2000a). Os valores máximos de CYP450 (57 – 78 pmol/mg prot) estão também de acordo com concentrações de CYP450 (43-83 pmol/mg prot) em mexilhões da Galiza (Solé *et al.*, 1995 b; Solé, 2000a; Porte *et al.*, 2001a), ou entre 48-69 pmol/mg prot em mexilhões da Catalunha (Porte *et al.*, 1991), e na baía de Arcachon, França (51,5 pmol/mg prot) (Suteau e Narbonne, 1988) (Tab. 1.5 – Cap. 1)

O CYP450 na glândula digestiva dos mexilhões é superior em VM e OL e inferior em FR e TV (Fig. 5.2), tal como observado para a concentração total dos HAs (Fig. 3.2 e

3.5) e PAHs (Fig. 4.2) acumulados nos tecidos. Pela análise canónica (CA) (Fig. 5.9 e 5.13) confirma-se uma associação entre VM e OL com concentrações máximas de CYP450, P418 e NADPH-red, e uma separação entre o Outono (devido a actividades de NADH-red máximas, em todos os locais) e os Invernos. A variação sazonal do CYP450 é idêntica em todos os locais, decresce do Inverno I para a Primavera e Verão, aumentando no Outono e Inverno II (Fig. 5.1), atingindo a concentração máxima no Inverno III (6 anos depois) (Fig. 5.11). Este decréscimo de CYP450 na Primavera e no Verão coincide com o decréscimo das concentrações totais de HAs (Fig. 3.1 e 3.4) e PAHs (Fig. 4.1) e com o aumento da temperatura da água (Tab. A - anexo), existindo uma correlação significativa com os hidrocarbonetos acumulados nos tecidos dos mexilhões, durante todo o período estudado (TAlc $r = 0,63$; UCM $r = 0,40$ (Tab. 5.3); PAHs $r = 0,34$ (Fig. 5.15 A). O mesmo padrão sazonal foi verificado em mexilhões da bacia do Ebro, em que a concentração total de CYP450 decresce gradualmente desde Fevereiro (86 pmol/mg prot) até Junho (47 pmol/mg prot) devido ao aumento da temperatura da água, tendo sido também acompanhado por um declínio acentuado das concentrações de PAHs acumulados nos tecidos (Solé *et al.*, 1995a). Por outro lado, picos CYP450 nos meses de Inverno também foram detectados em mexilhões *M. edulis* do Reino Unido (Kirchin *et al.*, 1992). Assim, o decréscimo da concentração de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) nos tecidos dos mexilhões e dos níveis bioquímicos do sistema MFO, na Primavera e Verão, foi também verificado por outros autores, no qual a descida acentuada de CYP450 foi verificada antes da desova e com o aumento da temperatura (Kirchin *et al.*, 1992; Solé *et al.*, 1995; Winstein 1995).

Uma distribuição similar ao CYP450 foi encontrada para os níveis de P418 (que representa cerca 11 a 21% da concentração total de CYP450), embora as diferenças

entre locais fosse menos acentuada. O P418 apresenta também uma correlação significativa com o CYP450, durante todo o estudo ($r = 0,76$ e $0,85$, respectivamente para o período anual – Fig. 5.10 e temporal – Fig. 5.14). Poucas diferenças espaciais na concentração de P418 foram também detectadas em mexilhões da costa Algarvia (Serafim *et al.*, 2008), da Lagoa de Veneza (Livingstone *et al.*, 1995), do Mar do Norte (Solé *et al.*, 1998) e da Galiza (Porte *et al.*, 2001 a) (Tab. 1.5 – Cap. 1).

A actividade da NADPH-red na fracção microssomal da glândula digestiva dos mexilhões variou entre 3,1 e 15,8 nmol/min/mg prot no período anual e entre 5,9 – 16,4 nmol/min/mg prot no Inverno III. Os valores máximos da actividade desta enzima estão de acordo com as registadas em mexilhões no delta do Ebro (Porte *et al.*, 1991), e na Galiza 6 meses após o derrame do petroleiro *Aegan Sea* (Solé *et al.*, 1996; Solé *et al.*, 2000 a; Porte *et al.*, 2000b), enquanto que os mínimos estão de acordo com as actividades encontradas em locais menos contaminados identificados quer em programas de monitorização (Solé *et al.*, 1995 ab; Solé, 2000 a) quer após um ano de um derrame de petróleo, onde se verificou um decréscimo até aos níveis basais, coincidente com um declínio de contaminantes nos tecidos, indicando uma recuperação ambiental (Porte *et al.*, 2000 b) (Tab. 1.5 – Cap. 1). A variação espacial (Fig. 5.3) e sazonal (Fig. 5.4) da enzima NADPH-red acompanha a variação do CYP450, ou seja as actividades são superiores nos meses mais frios sendo VM e OL os locais onde a actividade é superior e FR o local onde é inferior, confirmada também pela análise canónica (Fig. 5.9 e 5.13). A sua relação com os teores de CYP450 é significativa quer no período anual ($r = 0,73$; $p < 0,05$) (Fig. 5.10), quer no temporal ($r = 0,79$; $p < 0,05$) (Fig. 5.14), e superior nos locais onde a concentração de hidrocarbonetos é maior (VM e OL), existindo uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a actividade da NADPH-red

e os TAlc ($r = 0,43$) e a UCM ($r = 0,39$), mas não para os PAHs ($r = 0,23$). Resultados idênticos foram detectados em mexilhões da Galiza (Solé *et al.*, 1996). A inexistência de uma relação entre a actividade da NADPH-red e os PAHs é consistente com outros trabalhos (Livingstone *et al.*, 1988; Nasci *et al.*, 1989; Porte *et al.*, 1991; Solé *et al.*, 1995 a, 1996; Porte *et al.*, 2000 a), embora, um aumento significativo da actividade desta flavoproteína na fracção microssomal da glândula digestiva tenha sido detectada em mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a 29 e 123 ppm de gasóleo, quer por períodos curtos (8 dias) quer períodos longos (4-16 meses), sendo no entanto mais expressiva no gastrópode *Littorina littorea* (Livingstone *et al.*, 1985, 1989).

A variação espacial (Fig. 5.5), sazonal (Fig. 5.6) e temporal (Fig. 5.12 A) do citocromo b_5 mostra, tal como para os outros componentes do sistema MFO, concentrações mais elevadas em VM e OL em todos os meses e em SG no Outono e no Inverno II, com tendência para aumentar em todos os locais no Inverno III, embora as diferenças entre os Inverno II e III não sejam significativas em SG, TV e VRSA. A concentração de citocromo b_5 nos mexilhões da costa Sul de Portugal é da mesma ordem de grandeza de concentrações encontradas por outros autores (Tab. 1.5 – Cap.1), embora os valores mínimos sejam inferiores. A distribuição da actividade da NADH-red (Fig. 5.7, 5.8 e 5.12 B) é também idêntica à reportada na literatura (Tab. 1.5 – Cap. 1) e acompanha a variação do citocromo b_5 , com actividades superiores em todos os locais no Outono e Inverno III, existindo relações lineares e significativas ($p < 0,05$) para todos os meses, excepto no Outono ($p > 0,05$). Esta variação entre o citocromo b_5 e a sua reductase (Fig.5.14; Tab. 5.2) é esperada uma vez que a actividade desta flavoproteína depende grandemente do citocromo b_5 (Kirchin *et al.*, 1992). Ambos apresentam, no período anual e temporal, um padrão semelhante ao dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos,

sendo a relação significativa para o citocromo b₅ (TAlc $r = 0,35$; UCM $r = 0,39$; PAHs $r = 0,44$) mas não para a NADH-red.

Contrariamente ao CYP450, o citocromo b₅ está principalmente envolvido na oxidação de substratos endógenos agindo como componente de transferência de electrões num número de reacções oxidativas, como no metabolismo anaeróbio de gorduras e esteróis (Porter, 2002). A capacidade do citocromo b₅ em aumentar e estimular as reacções catalíticas do CYP450 é reconhecida (Zhang *et al*, 2005), pois pode também participar no catabolismo de xenobióticos (Schenkman e Jansson, 2003), ocorrendo este aumento por três vias: transferência directa dos dois electrões requeridos da NADH-red para o CYP450, num ciclo separado e independente da NADPH-red; transferência do segundo electrão para o ferro(II) do CYP450 a partir tanto da NADH-red como da NADPH-red; e estimulação alostérica do CYP450 sem transferência de electrões (Porter, 2002). Os resultados mostram haver também uma relação significativa ($p < 0,05$) entre o CYP450 e os restantes componentes do sistema MFO, quer anual (NADPH-red $r = 0,73$; Cit b₅ $r = 0,68$ e NADH-red $r = 0,499$) (Fig. 5.10; Tab. 5.1), quer temporalmente (NADPH-red $r = 0,79$; Cit b₅ $r = 0,69$ e NADH-red $r = 0,76$) (Fig. 5.14; Tab. 5.2). Assim, a actividade metabólica do CYP450 nos microsomas da glândula digestiva dos mexilhões parece ser auxiliada pelo citocromo b₅, assim como pela via independente da NADH-red, que por sua vez também participa nas reacções catalíticas do citocromo b₅.

O uso do CYP450 (e das restantes componentes do sistema MFO) como biomarcador de exposição a óleos e compostos orgânicos é suportado por variadíssimos trabalhos de campo e laboratório, nos quais a concentração do citocromo P450 total, da sua isoforma CYP1A1, e das suas actividades metabólicas específicas (BPH; EROD, DT-diaforase) aumentam significativamente na presença de PAHs (benzo(a)pireno), e produtos

derivados do petróleo, em gradientes espaciais de contaminação associadas a derrames de petróleo e/ou a actividades industriais e urbanas, tanto em mexilhões (Gilewicz *et al.*, 1984; Michel *et al.*, 1992, 1993; Livingstone *et al.*, 1995, 1998; Solé *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2002; Bebianno *et al.*, 2007; Serafim *et al.*, 2008), como em berbigões (Moore *et al.*, 1987), conquilhas (Yawetz *et al.*, 1992), e peixes (Burgeot *et al.*, 1996; Corsi *et al.*, 2003; Lee e Anderson, 2005; Lavado *et al.*, 2006; Damásio *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008).

Nesta dissertação, o efeito da contaminação orgânica no CYP450, foi avaliada na fracção dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos. Deste modo, o CYP450, a NADPH-red e o citocromo b5 estão directamente relacionados com a concentração de hidrocarbonetos alifáticos (TAlc e UCM), sendo os *n*-alcanos de elevado peso molecular os que mais se relacionam com o sistema MFO, estando o C24 e C26 (petrogénicos) mais próximo do CYP450 e os C27-C29 (biogénicos) mais próximo da NADH-red (Fig. 5.16 A, C). Por outro lado, os *n*-alcanos de baixo peso molecular (C14-C23), que incluem a maioria dos locais do Inverno I, e todos da Primavera e Verão, estão menos relacionados com o sistema MFO, onde as concentrações de TAlc são menores, e apresentam características biogénicas marinhas (C17). A variação do CYP450 e de TAlc aumenta do Inverno I para o II (com mínimos na Primavera e Verão) (Fig. 3.1, 5.1 Tab. 3.1), com máximos em todos os locais no Inverno III (Fig. 3.9 A, 5.11; Tab. 3.7). A concentração de CYP450 é maior em VM e OL (ocasionalmente em PT no Outono), mínima em FR e TV, e é também menor nos meses da Primavera e Verão, relativamente aos meses mais frios (dados apresentados na Tab. A3 - anexo). A concentração de UCM e PAHs decresce do Inverno I para o II (Fig. 3,4; 4.1; Tab. 3.1), e no III é semelhante à do Inverno II (Fig. 3.9 B; Fig. 4.11; Tab. 3.7).

Os hidrocarbonetos alifáticos encontram-se frequentemente presentes no meio marinho como resultado do tráfego marítimo, limpeza de tanques das embarcações, e outras actividades industriais e costeiras, além de serem a principal fracção do petróleo.

Embora se conheçam relações significativas entre a benzo(a)pireno hidroxilase (BPH) e os TAlc ($r = 0,94$) e a UCM ($r = 0,98$) em mexilhões da Lagoa de Veneza (Solé *et al.*, 2000 a) e entre a NADPH-red e os TAlc ($r = 0,71$) na Galiza, em locais onde o *input* biogénico (C15, C17 e C29) foi também importante (Solé *et al.*, 1996) (Tab. 1.5 – Cap. 1), esta é a primeira vez que se relaciona a indução do sistema MFO em moluscos bivalves com a acumulação de *n*-alcanos individuais.

A concentração de CYP450 (e dos restantes componentes do sistema MFO) acompanha a distribuição espacial e sazonal dos PAHs, ocorrendo concentrações de CYP450 e de Cit b₅ superiores nos locais onde a concentração de PAHs também é superior (VM e OL), e apresenta mínimos nos meses e locais em que os teores de PAHs são também menores (Primavera e Verão; FR e TV), demonstrando assim a sua capacidade de resposta a gradientes de contaminação. As reductases apresentam também uma variação semelhante à dos PAHs, no entanto, a relação entre estas e os PAHs não é significativa ($p > 0,05$). Enquanto se verifica um aumento gradual do CYP450 no estudo anual e temporal, verifica-se um decréscimo da contaminação por PAHs em toda a costa, o que não impede a existência de uma relação significativa entre a concentração de CYP450 e PAHs para a globalidade dos dados ($r = 0,34$) e para a maioria dos meses (Fig. 5.15), indicando uma variação espacial idêntica. Os declives das rectas (que reflectem a capacidade catalítica do CYP450) aumentam do Inverno I (0,007) para o II (0,02) e III (0,05), indicando taxas de biotransformação superiores para concentrações de PAHs menores. As taxas de metabolização menores no Inverno I, particularmente em VM,

onde a concentração de TPAH (5035 ± 925 ng/g ph) é máxima são também evidenciadas pelos baixos valores de CYP450 ($30,1$ pmol/mg prot). No entanto, dada a relativamente baixa taxa de metabolização dos PAHs *in vivo* em moluscos bivalves (Winston e Di Giulio, 1991), os PAHs, presentes tendem a acumular-se. A redução da capacidade catalítica do citocromo P450 por concentrações muito elevadas de PAHs foi observada em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos 6 meses depois de um derrame de petróleo na costa da Galiza (Solé *et al.*, 1996). Os níveis médios de PAHs no Inverno I (1464 ± 819 ng/g ph; Fig. 4.1) são superiores aos registados nesse estudo (977 ng/g ph), e a concentração de CYP450 é menor ($30,1 \pm 11,1$ (Fig. 5.1) e $57,6$ pmol/mg prot (Tab. 1.4; Solé *et al.*, 1996), respectivamente), indicando uma relativa saturação do sistema MFO, principalmente em VM, tal como ocorreu após o derrame (Solé *et al.*, 1996). No Inverno II e em VM, os teores de PAHs são máximos mas inferiores aos do Inverno I e a concentração de CYP450 superior, revelando uma maior taxa de metabolização. A concentração de TAlc e UCM foram máximas em VRSA, acompanhado por incrementos de TPAHs pouco significativos, mas significativos de CYP450, relativamente ao Inverno I. Assim, o CYP450 parece ter sido induzido em VRSA devido à presença de hidrocarbonetos alifáticos petrogénicos e aromáticos pirolíticos, enquanto que em VM essa indução se deve principalmente a hidrocarbonetos pirolíticos. A distribuição espacial e sazonal dos hidrocarbonetos individuais (Fig. 5.16), mostra que os *n*-alcanos e os PAHs (pirolíticos) de elevado peso molecular estão mais relacionados com o sistema MFO, e que mesmo quando os PAHs são analisados em separado dos *n*-alcanos (Fig. 5.16 B), o BaP, o BkF e o DahA são os que melhor se relacionam com o CYP450 e NADPH-red, e os petrogénicos (N, Flr, Fen, Ant) menos.

Deste modo, parece que as elevadas concentrações de PAHs provocaram uma saturação do sistema MFO, que não foi capaz de metabolizar os PAHs à velocidade suficiente para os tornar excretáveis, vindo esta capacidade a aumentar ao longo do tempo devido ao decréscimo de concentração dos PAHs acumulados nos tecidos, respondendo o CYP450 mais rapidamente a concentrações menores de PAHs (Fig. 5.15).

Outro factor que deve ser tomado em conta é a presença de outros contaminantes ambientais na costa Sul Algarvia, como os metais (Bebiano e Machado, 1997; Morgado e Bebianno, 2005; Serafim e Bebianno, 2007), TBT (Coelho *et al*, 2002) e PCBs (Ferreira e Vale, 1995, 1998; Barroso *et al*, 2004), que podem ter efeitos antagónicos no sistema MFO. Esta mistura complexa de compostos acumulados nos tecidos dos mexilhões pode inibir a actividade do CYP450 ao invés de activá-la (Jimenez *et al*, 1990; Goksöyr *et al*, 1991; Solé, 2000 b). O TBT é reconhecido como inibidor do sistema MFO em bivalves (Morcillo e Porte, 2000). O TBT é um disruptor endócrino responsável pela masculinização das fêmeas de gastrópodes, sendo os seus níveis na costa Sul de Portugal considerados muito elevados, (Coelho *et al*, 2002; Diez *et al*, 2005), o que poderá de algum modo diminuir a eficácia do sistema MFO, em determinados locais da costa.

Globalmente, este estudo demonstra o potencial do CYP450 enquanto biomarcador de exposição a hidrocarbonetos do petróleo e a PAHs, pois níveis elevados de CYP450 foram encontrados em locais sujeitos a contaminações petrogénicas e pirolíticas mais elevadas, demonstrado ao longo de um gradiente espacial, característico de intenso tráfego marítimo e actividades portuárias costeiras.

5.5 – CONCLUSÕES

A concentração e actividades dos componentes do sistema MFO são da mesma ordem de grandeza dos detectados noutros locais, havendo uma interdependência entre si: o CYP450 correlaciona-se positivamente com o P418 ($r = 0,76$ e $0,85$), a NADPH-red ($r = 0,73$ e $0,79$), o citocromo b_5 ($r = 0,68$ e $0,69$) e a NADH-red ($r = 0,49$ e $0,76$), respectivamente no período anual e temporal. O citocromo b_5 e a NADH-red também se relacionam entre si ($r = 0,69$ e $0,81$). A NADH-red e o citocromo b_5 parecem assim participar na actividade catalítica do CYP450, em que a NADH-red é usada na transferência de electrões para o CYP450, quer por intermédio do citocromo b_5 como por uma via independente da NADPH-red.

A concentração e actividade dos componentes do sistema MFO apresentam uma variação espacial, sazonal e temporal semelhante à de hidrocarbonetos alifáticos (Cap. 3) e aromáticos (Cap. 4), com teores elevados nos locais onde a presença de contaminantes também é mais elevada (VM e OL). O CYP450 e o citocromo b_5 correlacionam-se com a concentração de hidrocarbonetos alifáticos (TAlc e UCM) e aromáticos (PAHs), enquanto que a NADPH-red apenas tem uma relação significativa com os alifáticos e a NADPH-red não se relaciona com nenhuma das fracções dos hidrocarbonetos. Existe assim uma resposta do CYP450 ao gradiente de contaminação crónica, associada a actividades de marinas e portos, sendo a primeira vez que se relaciona a indução do sistema MFO em moluscos, com a acumulação de *n*-alcanos.

A capacidade indutora do CYP450 por PAHs diminuiu no Inverno I relativamente aos restantes, devido à concentração extrema de PAHs particularmente em VM, que poderá ter saturado a capacidade metabólica do sistema MFO. Esta capacidade aumentou nos

meses seguintes, respondendo o CYP450 mais rapidamente a concentrações menores de PAHs.

Na Primavera e no Verão, tanto as concentrações de hidrocarbonetos nos tecidos, como a concentração de CYP450 na fracção microsomal da glândula digestiva dos mexilhões, diminuíram significativamente, talvez devido à variação da temperatura e ao ciclo sexual dos indivíduos.

Globalmente, o CYP450 nos mexilhões da costa Sul de Portugal reflecte o gradiente de contaminação ambiental por hidrocarbonetos do petróleo e poderá ser utilizado como biomarcador de exposição a este tipo de compostos.

**6 - RESPOSTA DO SISTEMA DEPENDENTE DO CYP450 À VARIAÇÃO DOS
TEORES EM HIDROCARBONETOS EM MEXILHÕES *Mytilus*
galloprovincialis TRANSPLANTADOS NA COSTA SUL DE PORTUGAL**

6.1 – INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos estão expostos à influência contínua de compostos orgânicos de origem antropogénica que se podem acumular nos seus tecidos. A principal resposta dos organismos a este tipo de exposição é transformar estes compostos por intermédio de reacções bioquímicas em compostos inactivos e rapidamente excretáveis. Esta desintoxicação metabólica envolve uma grande variedade de enzimas e é normalmente dividida em duas fases: a fase I ou fase das reacções funcionais (biotransformação) e a fase II ou fase de reacções de conjugação (ver Cap. 1). O metabolismo da fase I é essencialmente constituído por reacções de oxidação catalisadas pelo sistema de oxigenases de função mista (MFO) cujas componentes principais são o citocromo P450 e as NAD(P)H-citocromo *c* reductases. O sistema dependente do citocromo P450 é indutível por exposição a compostos orgânicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), os quais são subsequentemente metabolizados (Livingstone 1996; Porte *et al.*, 2001), e por isso tem sido usado como biomarcador de exposição, uma vez que as alterações ao sistema MFO reflectem as concentrações de PAHs do meio (Livingstone, 1988, Porte *et al.*, 1991, Porte *et al.*, 2001, Solé *et al.*, 1995) (ver Cap. 1 e Cap.5).

Devido ao aumento de concentração de contaminantes orgânicos no meio marinho, tornou-se necessário avaliar o impacto de tais compostos nos organismos aquáticos. Em termos de bioacumulação, os organismos sésseis, e com distribuição generalizada, como os mexilhões, são largamente utilizados como espécie indicadora (Solé *et al.*, 1995; Cajaraville *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos referem a importância de um estudo integrado quando se avalia a qualidade ambiental e o efeito do tóxico nos organismos. Assim, a aplicação da biomonitorização activa (BA), na qual organismos de um local não contaminado são

transplantados para um local contaminado, dá-nos a vantagem de assegurar situações comparáveis, reduzindo a variabilidade dos resultados normalmente encontrada em estudos de campo (Nasci *et al.*, 1999).

O presente Capítulo pretende integrar a biomonitorização activa em mexilhões transplantados de Tavira, local medianamente contaminado por hidrocarbonetos (HA e PAHs), para Vilamoura, um dos locais da costa Sul mais contaminado com hidrocarbonetos (Cap. 3 e 4), e *vice-versa*. Assim, serão avaliadas as alterações nas concentrações totais dos hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) quando indivíduos de um local não contaminado são colocados num local onde a contaminação por hidrocarbonetos é mais elevada (acumulação), e quando indivíduos contaminados são colocados num local “limpo” (depuração). Dado que estes locais apresentam perfis distintos em termos de compostos individuais, quer HAs quer PAHs (Cap. 3 e 4), é ainda objectivo deste Capítulo avaliar até que ponto essas características se mantêm ou se se alteram, e quais os hidrocarbonetos que se sobre impõem preferencialmente. É também objectivo deste transplante cruzado estudar as alterações ocorridas no sistema MFO, particularmente no CYP450, e avaliar a sua capacidade enquanto biomarcador de exposição (Cap. 5).

6.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* (4 - 6 cm) foram recolhidos em Tavira (local medianamente contaminado) e em Vilamoura (local muito contaminado) em Junho de 2004. No início do ensaio foram recolhidos 40 indivíduos de cada local (dia 0) e mais

200 que depois de separados em grupos de 40 foram transplantados do local original para o outro, ou seja de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. Posteriormente foram recolhidos grupos de 40 mexilhões nos dias 7, 14, 21 e 28. No dia 28, um grupo de 40 mexilhões foi recolocado no local original (ou seja, mexilhões de Tavira que estiveram em Vilamoura voltam para Tavira), e foi recolhido 32 dias depois (dia 60). Em simultâneo foi recolhido um segundo grupo, no respectivo local de origem (ou seja, Tavira em Tavira, após 60 dias) (controlo dia 60 - C60).

A concentração dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos nos tecidos moles e a concentração e actividades dos componentes do sistema MFO na glândula digestiva dos mexilhões foram determinadas conforme descrito no Capítulo 2. Os resultados são expressos em termos de média \pm desvio padrão. A diferença entre a concentração dos hidrocarbonetos e a concentração e a actividade dos componentes do sistema MFO, durante os 60 dias de ensaio, foi avaliada por análise de variância (ANOVA), à qual foi aplicada o teste de Duncan, para um nível de significância de 0,05. Para cada local, as alterações ao longo do tempo foram também avaliadas pela análise dos componentes principais (PCA) utilizando o programa Canoco (Ter Braak, 1995). As relações entre os diferentes componentes do sistema MFO, e entre estes e as concentrações de hidrocarbonetos foram estudadas pela análise de regressão. Para avaliar qual dos hidrocarbonetos individuais tem mais influência no CYP450 foi também utilizada a análise de regressão e a análise multivariada (ver Cap. 2)

6.3 – RESULTADOS

6.3.1 – Hidrocarbonetos Alifáticos

Os resultados obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos (*n*-alcanos e isoprenoides) e UCM, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e *vice-versa*, estão representados na Figura 6.1 e nas Tabelas 6.1 e 6.2.

A concentração de TAlc nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura aumenta gradualmente até ao dia 28 (Fig. 6.1A), com uma taxa de acumulação de 0,39 $\mu\text{g/g/dia}$ ($r=0,98$; $p<0,05$), atingindo uma concentração ($12,7 \pm 2,3 \mu\text{g/g ph}$), cerca de 6 vezes superior à do início do transplante ($2,1 \pm 0,26 \mu\text{g/g ph}$) ($p<0,05$). Após terem sido recolocados no local de origem (dia 60), os teores de TAlc nos mexilhões de Tavira diminuíram 40% ($7,6 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$; $p<0,05$), tendo os mexilhões mostrado sinais de recuperação. No entanto, a concentração atingida após depuração ainda é superior à do início do ensaio ($2,1 \pm 0,26 \mu\text{g/g ph}$) ($p<0,05$), mas semelhante à dos mexilhões autóctones recolhidos no final do ensaio (C60) ($4,1 \pm 0,5 \mu\text{g/g ph}$). A concentração de TAlc nos dias 0 e C60 são semelhantes, o que significa que durante um período de 2 meses as condições ambientais em Tavira não se alteraram e que o aumento verificado nas três semanas de transplante se deve ao facto de se encontrarem num local mais contaminado.

Embora a concentração de TAlc nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira (Fig. 6.1B), seja semelhante nas primeiras duas semanas de ensaio (entre $11,1 \pm 1,3 \mu\text{g/g ph}$ (dia 0) e $11,5 \pm 1,3 \mu\text{g/g ph}$ (14º dia; $p>0,05$), a taxa de decréscimo dos teores de TAlc do dia 7 para o dia 21 é de $0,57 \mu\text{g/g/dia}$ ($r=0,97$; $p<0,05$), atingindo níveis inferiores aos iniciais ($5,8 \pm 0,6 \mu\text{g/g ph}$), indicando uma diminuição da

concentração de TAlc. No entanto, no dia 28 houve um aumento significativo da concentração de TAlc para $31,3 \pm 4,7 \mu\text{g/g ph}$. Quando os indivíduos foram recolocados em Vilamoura por 30 dias, a concentração de TAlc decresce 34% (dia 60 - $20,7 \pm 2,1 \mu\text{g/g ph}$), para níveis semelhantes aos dos indivíduos autóctones (C60 - $18 \pm 2,4 \mu\text{g/g ph}$) ($p > 0,05$), que tinham concentrações superiores às do dia 0 ($11,1 \pm 1,3 \mu\text{g/g ph}$) ($p < 0,05$).

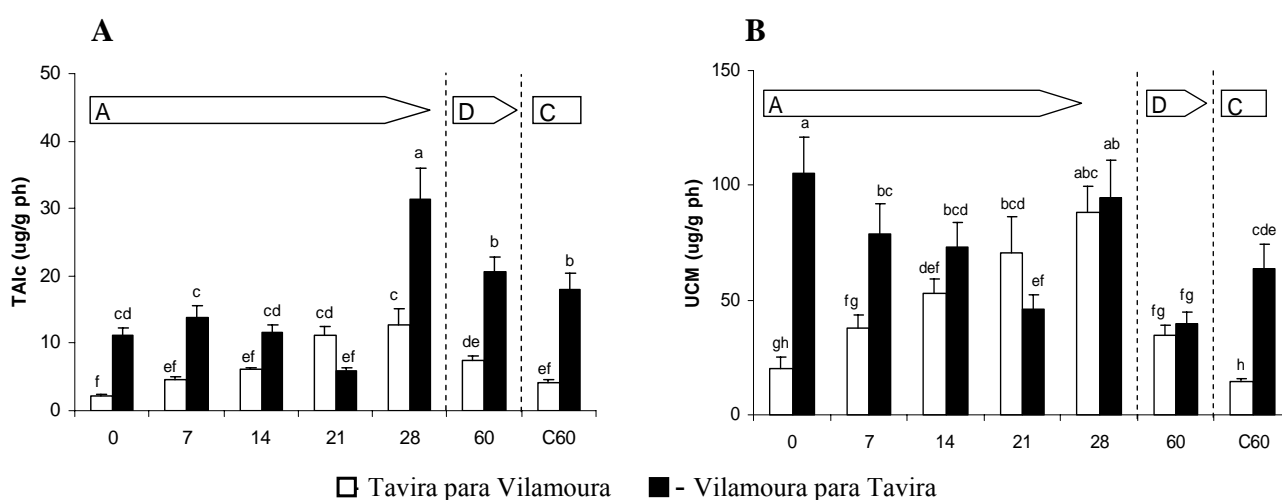


Figura 6.1 - Concentração de *n*-alcanos totais TAlc (A) e de UCM (B), nos tecidos moles de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; D – depuração; C – controlo; média \pm desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

Quanto à variação dos níveis de UCM nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura (Fig. 6.1B), esta segue o mesmo padrão da concentração TAlc, ou seja, aumenta até ao dia 28, com uma taxa de incremento de $2,4 \mu\text{g/g/dia}$ ($r=0,98$; $p < 0,05$), onde atinge o valor máximo ($88 \pm 11,5 \mu\text{g/g ph}$; $p < 0,05$). A UCM acumulada nos tecidos dos mexilhões durante este período decresce cerca de 60% quando os mexilhões são novamente recolocados em Tavira (dia 60 - $34,4 \pm 4,7 \mu\text{g/g ph}$), para níveis comparáveis aos níveis iniciais ($20,4 \pm 4,9 \mu\text{g/g ph}$) mas superiores aos níveis dos mexilhões autóctones do dia 60 (C60 - $14,5 \pm 1,8$) ($p > 0,05$).

Quando os mexilhões de Vilamoura foram transplantados para Tavira, a UCM decresce do dia 0 ($105,2 \pm 15,6 \mu\text{g/g ph}$) até ao dia 21 ($46,1 \pm 6,4 \mu\text{g/g ph}$), com uma taxa de $2,6 \mu\text{g/g/dia}$ ($r=0,97$; $p<0,05$) voltando a aumentar no dia 28 ($94,3 \pm 16,8 \mu\text{g/g ph}$), tal como ocorrido para os *n*-alcanos. Trinta dias após os mexilhões terem sido recolocados no seu local de origem (dia 60) a concentração de UCM diminuiu 57% ($39,7 \pm 5 \mu\text{g/g ph}$) ($p<0,05$), atingindo níveis inferiores à concentração de UCM dos indivíduos autóctones (C60 - $63,9 \pm 10,7 \mu\text{g/g ph}$).

Tal como no Capítulo 3 a análise dos *n*-alcanos individuais e isoprenoides, assim como das razões de diagnóstico entre determinados hidrocarbonetos, foi efectuada para avaliar o grau, tipo e características da contaminação. Os resultados referentes à concentração individual dos *n*-alcanos (C14-C36) e isoprenoides (pristano e fitano), da razão UCM/TAlc, do CPI, e das razões C17/C29, Pris/Fit, C17/Pris e C18/Fit, para ambos os transplantes, estão representados nas Tabelas 6.1 e 6.2.

A proporção entre a concentração dos hidrocarbonetos não resolvidos (UCM) e a concentração dos *n*-alcanos resolvidos (TAlc) reflecte o grau de degradação ambiental e por conseguinte se a origem dos hidrocarbonetos é recente ou crónica. No ensaio de transplante cruzado, a razão UCM/TAlc variou entre 3 e 10 para os mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura e entre 2 e 9 no transplante inverso. Estes valores são da mesma ordem de grandeza dos observados no Inverno III para toda a costa Algarvia (Cap. 3), indicando contaminações recentes de hidrocarbonetos do petróleo, nas quais a fracção dos *n*-alcanos ainda não sofreu degradação. De salientar ainda que a concentração de TAlc e UCM nos mexilhões transplantados é menor que a detectada nos mexilhões do Inverno III, confirmando a diminuição contínua da concentração de hidrocarbonetos alifáticos (HAs) nestes locais.

Tabela 6.1 - Concentração individual dos *n*-alcanos e isoprenoides (ng/g ph), da UCM e TAlc (µg/g ph) e razões diagnóstico calculadas, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura.

	T0	T7	T14	T21	T28	T60	TC60
C14	68 ± 11	149 ± 23	82 ± 16	564 ± 51	536 ± 114	642 ± 147	88 ± 21
C15	18 ± 3	71 ± 10	89 ± 16	128 ± 19	266 ± 54	150 ± 6	55 ± 13
C16	31 ± 7	61 ± 10	86 ± 15	180 ± 36	449 ± 106	166 ± 11	62 ± 14
C17	61 ± 10	158 ± 26	176 ± 17	352 ± 68	492 ± 100	239 ± 19	87 ± 15
Pristano	71 ± 14	231 ± 22	235 ± 36	273 ± 55	917 ± 98	218 ± 9	64 ± 12
C18	69 ± 13	415 ± 102	387 ± 66	420 ± 76	432 ± 106	376 ± 88	126 ± 25
Fitano	79 ± 15	395 ± 75	391 ± 70	460 ± 104	814 ± 199	439 ± 91	163 ± 13
C19	132 ± 15	437 ± 87	775 ± 81	687 ± 108	580 ± 99	661 ± 105	252 ± 17
C20	169 ± 17	653 ± 89	867 ± 89	1055 ± 247	1146 ± 239	847 ± 136	402 ± 80
C21	155 ± 28	447 ± 94	703 ± 103	832 ± 95	740 ± 51	705 ± 110	426 ± 41
C22	175 ± 18	458 ± 107	777 ± 94	1205 ± 216	1635 ± 210	906 ± 98	401 ± 87
C23	161 ± 35	323 ± 62	595 ± 75	806 ± 80	848 ± 21	703 ± 91	312 ± 32
C24	116 ± 24	219 ± 28	392 ± 46	663 ± 141	1416 ± 170	527 ± 103	261 ± 61
C25	120 ± 22	156 ± 20	244 ± 34	405 ± 81	327 ± 14	337 ± 36	156 ± 38
C26	115 ± 21	127 ± 29	184 ± 44	531 ± 122	1008 ± 188	329 ± 55	180 ± 30
C27	102 ± 19	145 ± 24	132 ± 25	368 ± 71	283 ± 28	242 ± 55	215 ± 40
C28	97 ± 15	127 ± 13	108 ± 19	435 ± 101	878 ± 136	247 ± 46	228 ± 24
C29	99 ± 18	142 ± 26	117 ± 24	377 ± 40	665 ± 86	201 ± 41	213 ± 33
C30	81 ± 8	118 ± 23	90 ± 12	470*	309 ± 23	167 ± 4	206 ± 42
C31	121 ± 18	166 ± 19	150 ± 35	501*	343*	108 ± 22	280 ± 33
C32	73 ± 13	84 ± 11	81*	461*	322*	n.d.	141 ± 20
C33	58 ± 6	79 ± 11	77*	245*	147*	n.d.	24 ± 5
C34	39 ± 10	n.d.	n.d.	252*	311*	n.d.	n.d.
C35	45 ± 6	n.d.	n.d.	129*	92*	n.d.	n.d.
C36	n.d.	n.d.	n.d.	134*	230*	n.d.	n.d.
UCM (µg/g ph)	20,1 ± 4,9	37,9 ± 5,3	52,7 ± 6,6	70,8 ± 15,3	88 ± 11,5	34,4 ± 4,7	14,5 ± 1,8
Talc (µg/g ph)	2,1 ± 0,3	4,5 ± 0,5	6,0 ± 0,4	11,2 ± 1,4	12,7 ± 2,3	7,6 ± 0,5	4,1 ± 0,5
UCM / TAlc	10	8	9	6	7	5	3
Pris/Fit	0,89	0,59	0,60	0,59	1,13	0,50	0,39
C17/Pris	0,86	0,68	0,75	1,29	0,54	1,10	1,36
C18/Fit	0,87	1,05	0,99	0,91	0,53	0,86	0,77
C17/C29	0,62	1,11	1,51	0,94	0,74	1,19	0,41
CPI	1,04	0,88	1,00	0,76	0,55	0,80	0,96
H. principal (% do total)	C22 (8)	C20 (14)	C20 (14)	C22 (11)	C22 (13)	C22 (12)	C21 (10)

UCM – Unresolved Complex Mixture; TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice de Preferência de Carbono): $(\sum nC15-C35)/\sum nC14-C36$; *- somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal

Tabela 6.2 - Concentração individual dos *n*-alcanos e isoprenoides (ng/g ph), da UCM e TAlc (µg/g ph) e razões diagnóstico calculadas, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira.

	V0	V7	V14	V21	V28	V60	VC60
C14	380 ± 46	565 ± 83	239 ± 52	370 ± 55	523 ± 59	1559 ± 266	1160 ± 208
C15	202 ± 39	239 ± 51	66 ± 8	66 ± 9	132 ± 26	382 ± 93	380 ± 87
C16	315 ± 35	290 ± 37	83 ± 8	160 ± 24	181 ± 42	707 ± 161	617 ± 141
C17	246 ± 33	343 ± 45	111 ± 9	152 ± 18	204 ± 42	388 ± 53	586 ± 85
Pristano	618 ± 96	570 ± 110	32 ± 39	258 ± 57	204 ± 30	618 ± 82	1595 ± 390
C18	324 ± 39	829 ± 172	250 ± 33	429 ± 83	331 ± 75	992 ± 119	601 ± 120
Fitano	520 ± 85	1193 ± 263	386 ± 84	497 ± 104	410 ± 45	788 ± 183	1533 ± 163
C19	771 ± 176	1203 ± 171	325 ± 52	588 ± 79	545 ± 59	1236 ± 167	619 ± 141
C20	1108 ± 156	889 ± 123	283 ± 65	549 ± 126	626 ± 130	1648 ± 184	1388 ± 232
C21	945 ± 168	778 ± 170	221 ± 43	406 ± 66	742 ± 132	1246 ± 307	942 ± 168
C22	958 ± 150	1087 ± 200	403 ± 70	502 ± 112	1509 ± 226	2071 ± 507	1855 ± 156
C23	880 ± 154	892 ± 134	344 ± 69	320 ± 36	2610 ± 349	1278 ± 187	1062 ± 190
C24	750 ± 112	763 ± 102	396 ± 70	266 ± 60	3396 ± 660	1592 ± 156	1806 ± 111
C25	720 ± 132	709 ± 157	526 ± 85	235 ± 35	1960 ± 3345	795 ± 115	474 ± 79
C26	681 ± 135	877 ± 126	903 ± 106	188 ± 42	3830 ± 665	1088 ± 133	1230 ± 146
C27	538 ± 132	866 ± 134	1128 ± 65	255 ± 28	3700 ± 623	834 ± 117	384 ± 77
C28	495 ± 116	852 ± 207	1335 ± 110	212 ± 48	2787 ± 683	1112 ± 107	1057 ± 150
C29	489 ± 121	816 ± 195	1398 ± 77	218 ± 48	2827 ± 626	630 ± 120	308 ± 53
C30	342 ± 74	661 ± 150	1128 ± 108	204 ± 25	2359 ± 536	689 ± 159	1001 ± 152
C31	477 ± 80	663 ± 145	1104 ± 121	241 ± 56	2136 ± 502	505 ± 80	379 ± 94
C32	237 ± 40	343 ± 49	682 ± 101	173 ± 31	586 ± 80	994 ± 100	1024 ± 102
C33	234 ± 29	143 ± 24	341 ± 58	130 ± 26	145 ± 27	427 ± 73	171 ± 17
C34	n.d.	72*	134 ± 23	76 ± 14	138 ± 16	478 ± 98	530 ± 112
C35	n.d.	49*	58 ± 9	50 ± 6	48*	n.d.	122 ± 21
C36	n.d.	n.d.	53 ± 8	40 ± 6	32*	n.d.	277 ± 53
UCM (µg/g ph)	105,2 ± 15,6	78,6 ± 13,4	73,1 ± 10,9	46,1 ± 6,4	94,3 ± 16,8	39,7 ± 5	63,9 ± 10,7
Talc (µg/g ph)	11,1 ± 1,3	13,9 ± 1,6	11,5 ± 1,3	5,8 ± 0,6	31,3 ± 4,7	20,7 ± 2,1	18,0 ± 2,4
UCM / Talc	9	6	6	8	3	2	4
Pris/Fit	1,19	0,48	0,84	0,52	0,50	0,78	1,04
C17/Pris	0,40	0,60	0,34	0,59	1,00	0,63	0,37
C18/Fit	0,62	0,69	0,65	0,86	0,81	1,26	0,39
C17/C29	0,50	0,42	0,08	0,70	0,07	0,62	1,90
CPI	0,98	0,93	0,95	0,84	0,92	0,60	0,43
H. principal (% do total)	C20 (10)	C19 (9)	C29 (12)	C19 (10)	C26 (12)	C22 (10)	C22 (10)

UCM – Unresolved Complex Mixture; TAlc: $\sum nC14-C36$; CPI (Índice de Preferência de Carbono): $(\sum nC15-C35)/\sum nC14-C36$; *- somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado; n.d.: não detectado; H. principal: hidrocarboneto principal

A distribuição individual dos *n*-alcanos nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (Tab. 6.1; Fig. 6.2), apresenta um predomínio de *n*-alcanos entre o C17 e o C31 (dia 0), aumentando gradualmente a concentração dos *n*-alcanos pares à medida

que os mexilhões passam mais tempo em Vilamoura, principalmente C20, C22, C24, C26 e C28, atingindo o máximo no dia 28.

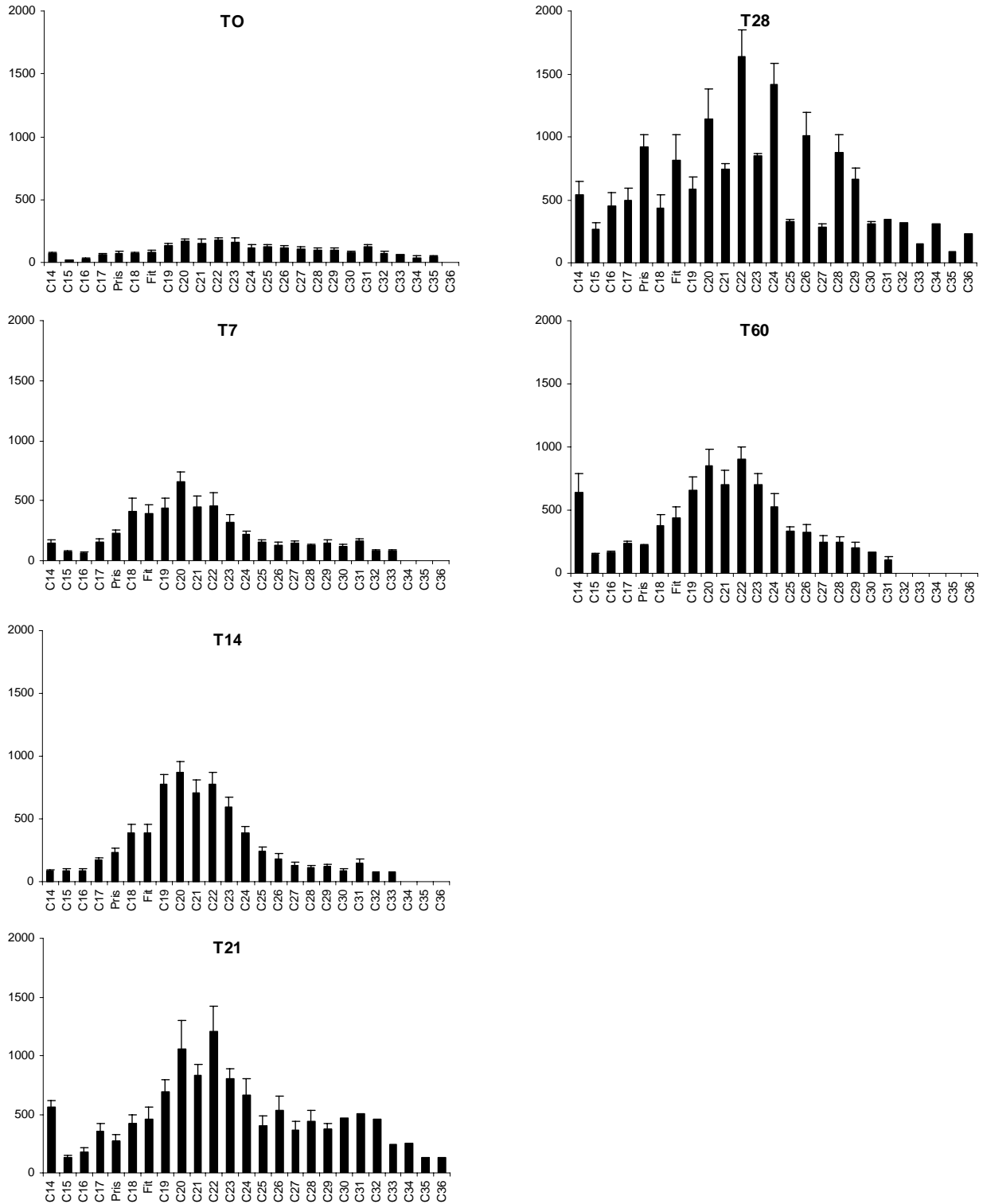


Figura 6.2 - Distribuição da concentração individual de *n*-alcanos (ng/g ph), em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura.

Estes *n*-alcanos pares são indicadores de origem petrogénica, o que também é evidenciado pelo baixo índice de preferência de carbono (CPI) registado. O CPI (razão entre os *n*-alcanos ímpares e os *n*-alcanos pares), é igual ou menor que 1 para o crude/petróleo e produtos do petróleo. Os valores de CPI no transplante de Tavira para Vilamoura variam entre 0,55 (dia 28) e 1,04 (dia 0).

No que diz respeito ao transplante de Vilamoura para Tavira (Tab. 6.2; Fig. 6.3), no dia 0 os *n*-alcanos predominantes situam-se entre o C19 e o C33, com máximos de C20, e sem predominância dos *n*-alcanos ímpares sobre os pares (CPI = 0,98), mantendo-se estas características até ao dia 7. Depois existe uma predominância de *n*-alcanos de elevado peso molecular (C26-C33) (dia 14), essencialmente devido ao C27, C29 e C31, característicos de plantas superiores terrestres. Este padrão de distribuição repete-se no dia 28, sendo diferente do padrão verificado nos indivíduos autóctones (C60), que apresenta domínio de *n*-alcanos pares sobre os *n*-alcanos ímpares e um CPI de 0,43, característicos do petróleo. Assim, os mexilhões de Vilamoura quando estiveram em Tavira adquiriram algumas características de *n*-alcanos terrestres provenientes da escorrência de rio Gilão, e os mexilhões de Tavira quando estiveram em Vilamoura adquiriram características petrolíferas, nomeadamente no aumento das concentrações dos *n*-alcanos pares.

A razão C17/C29, que representa a contribuição relativa dos *n*-alcanos biogénicos marinhos e os *n*-alcanos biogénicos terrestres, nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura (Tab. 6.1) passa de 0,62 (dia 0) para 1,11 e 1,51 (dias 7 e 14), confirmando uma alteração de *n*-alcanos terrestres para *n*-alcanos marinhos. No entanto, nos dias 21 e 28 o mesmo já não se verifica (C17/C29 < 1). Nos mexilhões autóctones do

dia 60 (C60) volta a verificar-se uma predominância do C29 em relação ao C17 (C17/C29 = 0,41).

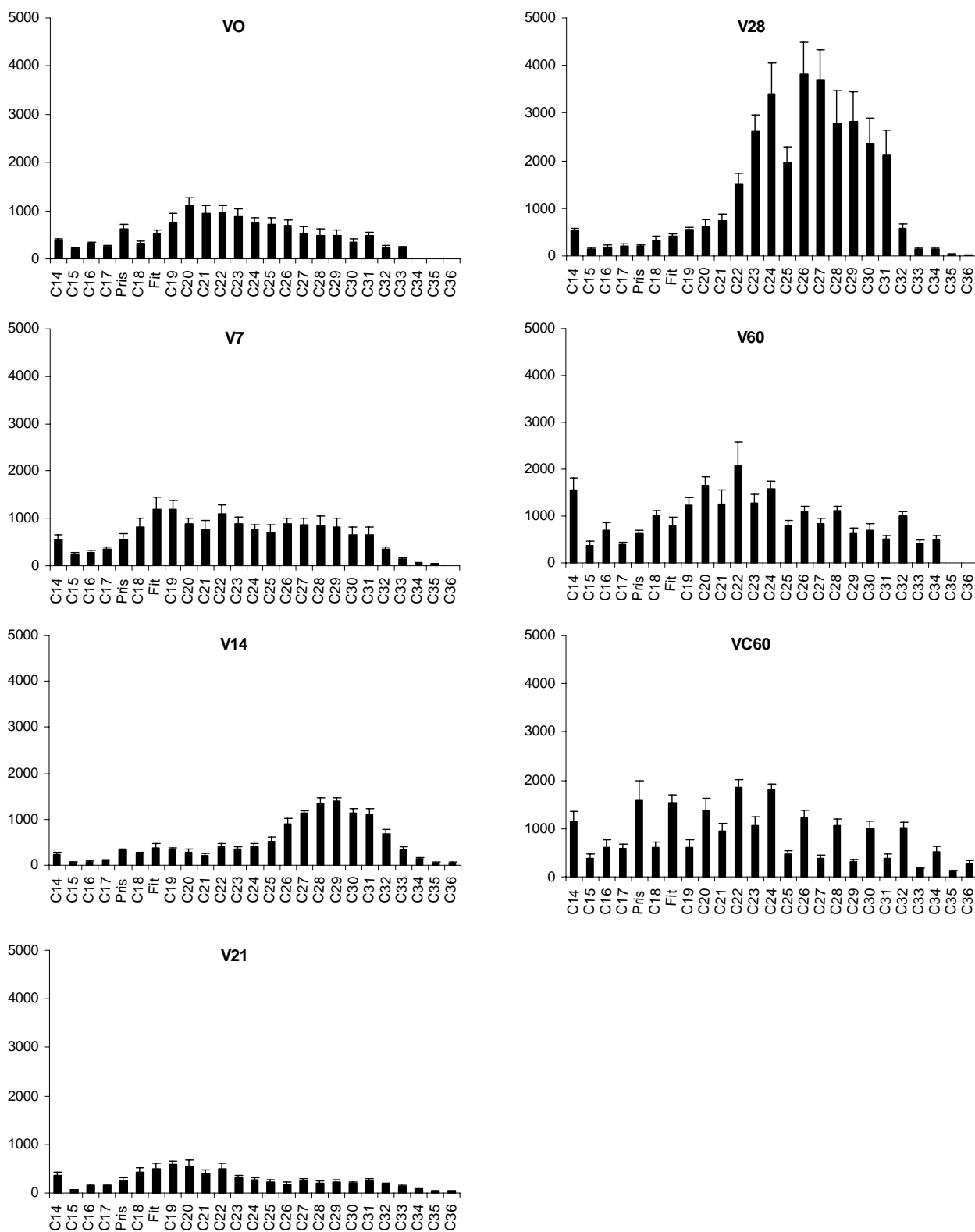


Figura 6.3 – Distribuição da concentração individual de *n*-alcanos (ng/g ph), em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira.

Nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, a razão C17/C29 (Tab. 6.2) é quase sempre <1 , apresentando valores de 0,08 e 0,07 (dias 14 e 28), indicando uma forte influência de compostos terrestres. No entanto, nos mexilhões autóctones (C60), esta razão (1,9) indica influência marinha.

A presença dos isoprenoides pristano e fitano é indicadora de produtos petrogénicos, sendo a sua proporção menor ou igual a 1 para os compostos de petróleo. Durante o transplante cruzado a razão Pri/Fit variou entre 0,39 e 1,3 nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, e entre 0,48 e 1,1 nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, indicando que em ambos os locais, as fontes de *n*-alcanos são petrogénicas. Por outro lado, as razões C17/Pris e C18/Fit indicam a taxa de degradação relativa entre os *n*-alcanos lineares e os isoprenoides ramificados, sendo usada para avaliar a presença de óleos e a relativa biodegradação dos *n*-alcanos. Valores baixos destes índices (≤ 1) são indicativos da presença de óleos degradados, enquanto que valores entre 4 e 8 indicam origem fitoplanctónica. Nos ensaios de transplante, estas razões variaram entre 0,53 e 1,29 nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e entre 0,34 e 1,26 nos mexilhões de Vilamoura transplantados para Tavira, indicando em ambos os locais a presença de óleos degradados, característico de contaminação crónica.

Com intuito de melhor clarificar a variação da concentração de todos os *n*-alcanos individuais, dos isoprenoides e das respectivas razões de diagnóstico, nos dois transplantes, foi aplicada a análise canónica de correspondência ao conjunto de dados, que foram transformados em proporção da concentração total. Na Fig. 6.4 os eixos 1 e 2 explicam 83,1 % da variância dos dados, separando na zona positiva do eixo 1 a maioria do transplante de Tavira para Vilamoura e os dias 60 e C60 dos mexilhões de

Vilamoura transplantados para Tavira. Na zona negativa estão a maioria dos mexilhões do transplante de Vilamoura para Tavira e os mexilhões relativos aos dias 28 e C60 dos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura. O eixo 1 separa ainda os *n*-alcanos de baixo peso molecular (C14-C23) dos de elevado peso molecular (C24-C36).

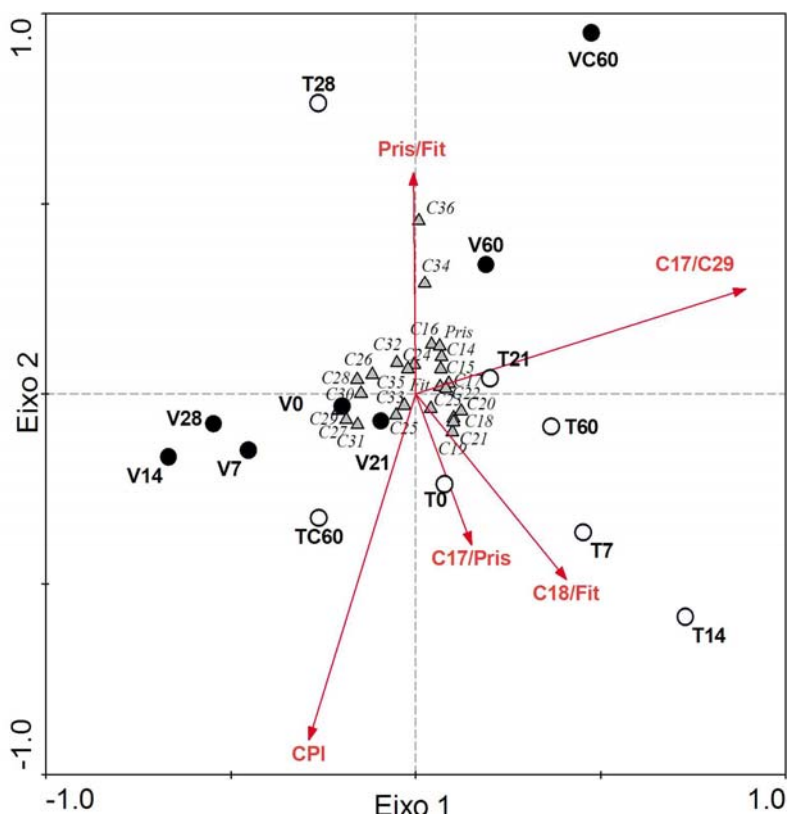


Figura 6.4 - Análise canónica de correspondência (CCA) dos *n*-alcanos e isoprenoides em relação às razões de diagnóstico, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V).

A CCA indica que no transplante de Tavira para Vilamoura os *n*-alcanos nos mexilhões recolhidos nos dias 0, 7 e 14 estão mais relacionados com as razões C17/Pris e C18/Fit (contaminações recentes) enquanto que os recolhido nos dias 21, 28 e 60 estão mais relacionados com a razão C17/C29 (*inputs* biogénicos) e Pis/Fit (*inputs* petrogénicos), assim como os dos dias 60 e C60 de Vilamoura, indicando que durante o período em

que os mexilhões de Tavira estiveram em Vilamoura adquiriram algumas características dos mexilhões autóctones de Vilamoura. Por outro lado, os mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira agrupam-se na zona negativa do eixo 1, em conjunto com o controlo (C60) de Tavira, indicando que também os mexilhões de Vilamoura adquiriram algumas características dos mexilhões originários de Tavira, como a concentração dos *n*-alcanos ímpares de elevado peso molecular e o consequente aumento do CPI.

6.3.2 – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os resultados relativos à concentração dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) obtidos nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e *vice-versa* estão representados na Fig. 6.5 (e nas Tabela 6.3 e 6.4). A concentração de TPAH nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura manteve-se inalterada durante a primeira semana de transplante, variando entre 443 ± 43 ng/g ph (dia 0) e 390 ± 35 ng/g ph (dia 7), aumentando depois até ao dia 28 (1876 ± 96 ng/g ph) onde atingiu a concentração máxima ($p < 0,05$). A taxa de incremento neste período de tempo (entre o dia 7 e o dia 28) foi de 66 ng/g/dia ($r = 0,96$; $p < 0,05$). Cerca de um mês depois de serem recolocados novamente em Tavira, a concentração de PAHs nos mexilhões diminuiu 27% (dia 60 - 1359 ± 125 ng/g ph), sendo significativamente superior à concentração dos mexilhões originários de Tavira (dia C60 - 623 ± 54 ng/g ph), cujos valores são semelhantes aos do início (T0) ($p > 0,05$).

Contrariamente ao ocorrido nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, no transplante de Vilamoura para Tavira, a concentração de TPAH diminuiu gradualmente do dia 0 (1052 ± 67 ng/g ph) até ao dia 21 (407 ± 51 ng/g ph), com uma taxa de 29 ng/g/dia, sofrendo um ligeiro aumento na semana seguinte (645 ± 133 ng/g ph), mas não significativo.

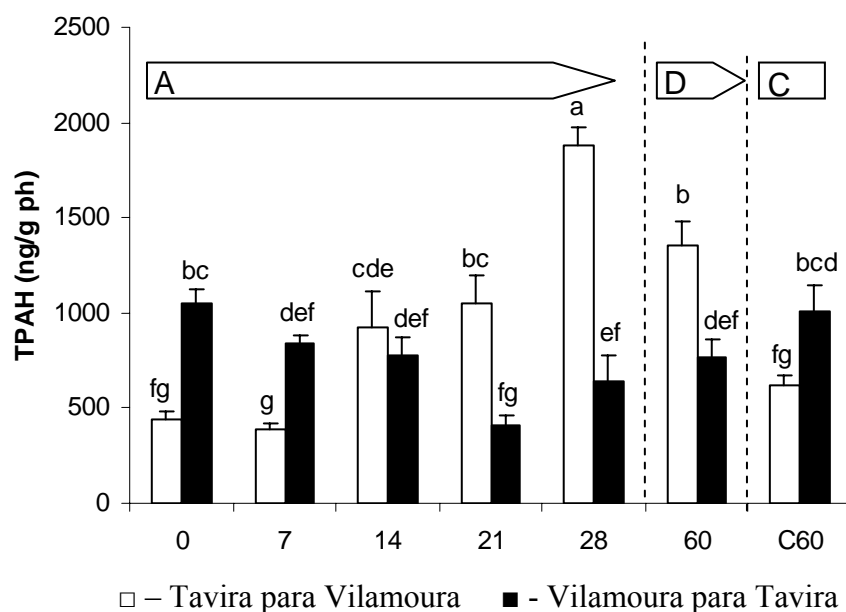


Figura 6.5 - Concentração total de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (TPAH) (ng/g ph) em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; D – depuração; C – controlo; média \pm desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

Quando são recolocados em Vilamoura um mês, a concentração de TPAH não se altera ($p > 0,05$) (dia 60 - 772 ± 93 ng/g ph), mas é inferior à dos mexilhões autóctones (dia C60 - 1010 ± 130 ng/g ph). Assim, parece que os mexilhões provenientes de um local mais limpo (Tavira) acumulam significativamente PAHs quando colocados num local mais contaminado (Vilamoura), ao mesmo tempo que existe uma eliminação de TPAH quando mexilhões de um local mais contaminado são colocados num local onde a

contaminação é menor. De salientar ainda que as concentrações de TPAH nos dias 0 e C60 de ambos os locais são da mesma ordem de grandeza das concentrações de TPAH verificadas no estudo anual e Inverno III, nestes locais (Capítulo 4).

Nas Tabelas 6.3 e 6.4 estão representados os resultados relativos à concentração de PAHs individuais, ao total (TPAH), assim como às razões de diagnóstico e à distribuição segundo o número de anéis, para ambos os transplantes.

Tabela 6.3 - Concentração individual e total dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ng/g ph), razões de diagnóstico e grupo de anéis, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura.

	T0	T7	T14	T21	T28	T60	TC60
Naftaleno (N)	11,6 ± 1,6	5,4 ± 1	114,4*	113,6*	50,4 ± 7,2	11,3 ± 0,9	18,7 ± 4,3
Acenaftileno (Acftil)	24,2 ± 2,7	3,1 ± 0,6	8,7*	30,7 ± 6,7	100,9 ± 24,9	81,1 ± 13,3	44,9 ± 9,5
Acenafteno (Acften)	105,5 ± 15,7	94,6 ± 13,3	82,7 ± 12,9	38,5 ± 6,6	241,2 ± 58,4	245,5 ± 4,4	213,1 ± 22,5
Fluoreno (Flr)	18,2 ± 1,9	6,9 ± 1,4	20,3 ± 4,5	73,3 ± 12,1	95,4 ± 8,5	20,6 ± 3,2	11,7 ± 2
Fenantreno (Fen)	18,8 ± 1,5	6,3 ± 1,4	16,5 ± 1,9	27 ± 3,6	17,5 ± 0,9	12,6 ± 2,6	15,3 ± 1,5
Antraceno (Ant)	5,9 ± 0,3	4,2 ± 0,8	4,8 ± 1	10,4 ± 2,3	11,1 ± 1,8	3,3 ± 0,7	11,9 ± 2,5
Fluoranteno (Flu)	17,9 ± 3,2	9,7 ± 1,5	34,1 ± 4	100,6 ± 13	137 ± 26,5	115,1 ± 8,9	42,1 ± 8,1
Pireno (Pir)	23,8 ± 5,9	11,0 ± 1,1	69,5 ± 10,1	66 ± 5,6	80 ± 13,4	41,5 ± 3,5	15,2 ± 0,7
Benzo(a)antraceno (BaA)	106,0 ± 11,6	119,6 ± 4,6	257,1 ± 32,8	251,5 ± 61,4	572,5 ± 76,8	472,4 ± 69,8	168,6 ± 12,9
Criseno (Cris)	84,7 ± 3	76 ± 4,4	193,3 ± 17,6	198,1 ± 14,1	418,2 ± 3,7	338,7 ± 21,8	61,9 ± 12,1
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	18,7 ± 4,4	49,4 ± 8,7	147,3 ± 32,3	78,4 ± 5	69,8 ± 14,4	14 ± 2,3	15,4 ± 1
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	13,8*	0,2*	54,7*	27,9 ± 4,8	47,1 ± 5,9	1,7 ± 0,1	2,6 ± 0,6
Benzo(a)pireno (BaP)	0,4*	1,6*	9,1*	16,5 ± 3,2	19,2 ± 1,8	0,1 ± 0,01	1,2 ± 0,2
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	0,4*	1,2*	5,5*	48,2 ± 9	7,5 ± 1,6	0,9 ± 0,06	0,24 ± 0,04
Benzo(g,h,i)perileno (Bper)	0,1*	0,5*	3,1*	18,4 ± 4,1	5,1 ± 1,1	0,2 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	0,03*	0,04*	1,02*	13 ± 1,4	3,1 ± 0,7	0,1 ± 0,02	0,03 ± 0,01
TPAH	443 ± 43	390 ± 35	924 ± 192	1055 ± 144	1876 ± 96	1359 ± 125	623 ± 54
Fen/Ant	3,18	1,48	3,45	2,59	1,57	3,87	1,28
Flu/Pir	0,75	0,88	0,49	1,52	1,71	2,77	2,76
Ant/Ant+Fen	0,24	0,40	0,22	0,28	0,39	0,21	0,44
Flu/Flu + Pir	0,43	0,47	0,33	0,60	0,63	0,74	0,73
BaA/BaA+Cris	0,56	0,61	0,57	0,56	0,58	0,58	0,73
IndP/IndP+Bper	0,40	0,09	0,25	0,42	0,38	0,25	0,43
2+3 anéis (%)	42	31	19	22	28	28	51
4 anéis (%)	53	56	61	58	64	71	46
5+6 anéis (%)	6	14	20	19	8	1	3
PAH principal (% do total)	BaA (24)	BaA (31)	BaA (28)	BaA (24)	BaA (31)	BaA (35)	Acften (34)

TPAH – soma da concentração individual dos 16 PAHs; * - somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado.

Em ambos os ensaios de transplante, a distribuição de PAHs por número de anéis (Fig 6.6) é semelhante no início e no fim do ensaio (0 e C60), ou seja em Tavira os compostos petrogénicos de 2+3 anéis apresentam concentrações superiores aos de 5+6

anéis, enquanto que em Vilamoura há um aumento de compostos derivados da combustão (pirolíticos) (5+6 anéis) relativamente aos petrogénicos (2+3).

Tabela 6.4 - Concentração individual e total dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ng/g ph), razões de diagnóstico e grupo de anéis, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira.

	V0	V7	V14	V21	V28	V60	VC60
Naftaleno (N)	30,4 ± 6,3	17,2 ± 3,8	9,3 ± 2	n.d.	77,1*	73,6 ± 12	79,6 ± 13
Acenaftileno (Acftil)	42,8 ± 4,1	45,9 ± 5,2	17,8 ± 4,2	19,5 ± 4,8	41,9 ± 6,4	29,9 ± 6,4	56,7 ± 2,6
Acenafteno (Acften)	78,1 ± 14,6	94,9 ± 16,8	95,4 ± 7,2	40,7 ± 7,2	69,2 ± 13,5	157,9 ± 7,4	54,3 ± 11,7
Fluoreno (Flr)	58,8 ± 13,4	51,3 ± 3,2	44,6 ± 10,9	15,3 ± 2,4	15,6 ± 3,2	15,2 ± 3,2	17,5 ± 3,8
Fenantreno (Fen)	24,7 ± 5,7	31,2 ± 5,6	47,8 ± 6,6	12,8 ± 2,7	33,6 ± 5,1	15,0 ± 1,9	16,9 ± 0,8
Antraceno (Ant)	17,5 ± 1,1	13,2 ± 0,6	37,4 ± 6,7	14,5 ± 0,9	26,4 ± 2,8	4,7 ± 0,6	6,0 ± 0,9
Fluoranteno (Flu)	135,6 ± 24,6	84,9 ± 12,8	143,9 ± 16,2	36,2 ± 8	74,9 ± 16,7	35,6 ± 7,2	85,9 ± 12,5
Pireno (Pir)	83,1 ± 9,7	43,4 ± 2,7	92,0 ± 11,1	19,0 ± 2,4	31,2 ± 5,5	46,3 ± 7,2	39,2 ± 3,4
Benzo(a)antraceno (BaA)	319,9 ± 61,2	239,3 ± 42,4	213,2 ± 45	149,5 ± 18,7	131,4 ± 16,2	236,0 ± 30,3	262,5 ± 24
Criseno (Cris)	149,8 ± 29	180,5 ± 13,6	17,1 ± 3,7	38,8 ± 1,8	88,4 ± 3	117,5 ± 3,5	174,0 ± 18
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	81 ± 16	28,2 ± 4,6	33,9 ± 7,5	40,7 ± 5,7	64,9 ± 14,3	34,1 ± 5,7	94,3 ± 21
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	14,4 ± 2,1	11,1 ± 1,8	14,5 ± 2,6	12,0 ± 0,2	24,2 ± 2,7	0,5 ± 0,1	81,1 ± 13,2
Benzo(a)pireno (BaP)	8,7 ± 1,2	3,2 ± 0,7	4,7 ± 0,6	5,5 ± 1,1	0,4 ± 0,1	5,3*	29,9 ± 3,1
Dibenzo(a,h)antraceno (DahA)	4,1 ± 0,5	0,60 ± 0,05	2,1 ± 0,5	2,3 ± 0,5	3,4 ± 0,4	2,7*	6,0 ± 0,9
Benzo(g,h,i)perileno (Bper)	2,7 ± 0,2	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	1,04*	1,8*	3,9 ± 0,8
Indeno(1,2,3 cd)pireno (IndP)	0,8 ± 0,1	0,05*	0,03*	0,05*	0,29*	0,8*	2,5 ± 0,3
TPAH	1052 ± 67	845 ± 38	774 ± 98	407 ± 51	645 ± 133	772 ± 93	1010 ± 130
Fen/Ant	1,41	2,37	1,28	0,88	1,27	3,21	2,84
Flu/Pir	1,63	1,96	1,56	1,91	2,40	0,77	2,19
Ant/Ant+Fen	0,42	0,30	0,44	0,53	0,44	0,24	0,26
Flu/Flu + Pir	0,62	0,66	0,61	0,66	0,71	0,43	0,69
BaA/BaA+Cris	0,68	0,57	0,93	0,79	0,60	0,67	0,60
IndP/IndP+Bper	0,23	0,40	0,23	0,38	0,22	0,31	0,39
2+3 anéis (%)	24	30	33	25	35	38	23
4 anéis (%)	66	65	60	60	51	56	56
5+6 anéis (%)	11	5	7	15	15	5	21
PAHs principal (% do total)	BaA (30)	BaA (28)	BaA (28)	BaA (37)	BaA (20)	BaA (31)	BaA (26)

TPAH – soma da concentração individual dos 16 PAHs; * - somente num dos replicados este hidrocarboneto foi identificado.

Nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (Fig. 6.6A) observa-se uma diminuição da proporção dos PAHs de 2+3 anéis (petrogénicos), e um incremento da proporção de PAH de 5+6 anéis (pirogénicos), do dia 0 para o 21, observando-se o padrão inverso nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira (Fig. 6.6B). No entanto, em ambos os locais os PAHs de 4 anéis são sempre predominantes, com percentagens que oscilam entre 46 e 71% no transplante de Tavira para Vilamoura e entre 51 e 66% no transplante inverso.

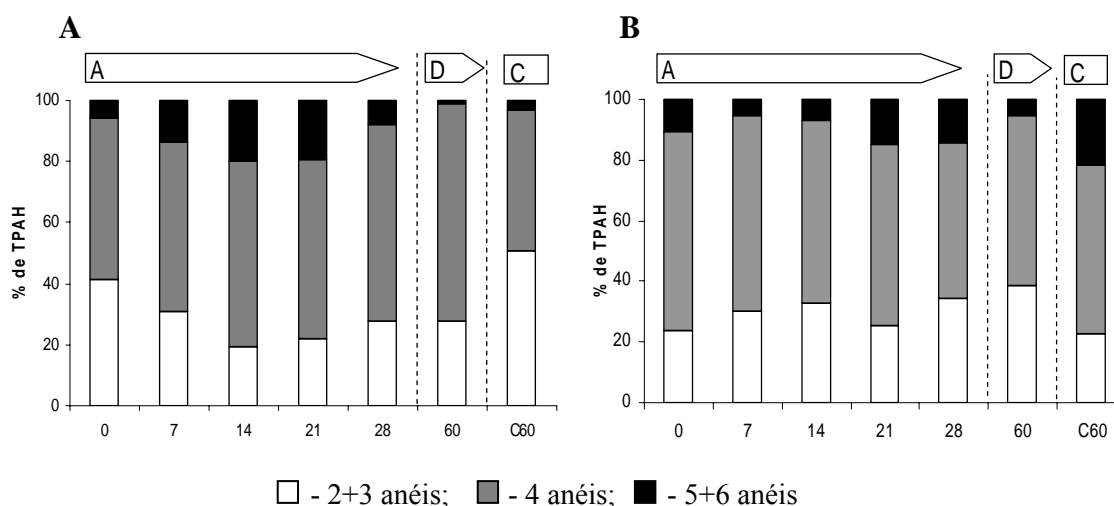


Figura 6.6 – TPAH agrupados por anéis (%), em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (A) e de Vilamoura para Tavira (B). (A – acumulação; D – depuração; C – controlo).

Do dia 28 para o dia 60, os mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura mantêm os teores de PAHs de 2+3 anéis (28%) mas os PAHs de 4 anéis aumentam (64%), enquanto que nos mexilhões autóctones recolhidos em Tavira (C60), os PAHs predominantes são os de 2+3 anéis (51%), seguidos dos de 4 anéis (46%). Nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira (Fig. 6.6 B), a percentagem dos PAHs entre o dia 28 e o 60 é semelhante, significando que após 30 dias no local de origem adquirem as características típicas de Tavira, ou seja, maior percentagem de PAHs de baixo peso molecular.

De facto, a análise da concentração individual dos 16 PAHs (Tab. 6.3 e 6.4; Fig. 6.7 e 6.8), indica que o PAH principal nos mexilhões de ambos os locais e durante o transplante é o BaA (4 anéis), que representa entre 20 a 37% da concentração de TPAH. Este PAH foi também predominante em toda a costa ao longo do período anual e temporal (Cap. 4 (Tab. 4.1 a 4.6)), seguido do Cris e do Flu. A concentração do BaA aumenta nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura do dia 0 para o dia 28,

acompanhado de um aumento de Cris e Flu também neste período, enquanto que nos indivíduos transplantados de Vilamoura para Tavira a concentração de BaA diminuiu no mesmo período (do dia 0 para o dia 28), acompanhado pela diminuição da concentração de Cris e Flu. Por outro lado, o Aceften (acenafteno) é o PAH de 3 anéis mais importante em ambos os locais, decrescendo nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, enquanto que nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira aumentou, acompanhado do aumento de fenantreno (Fen) e antraceno (Ant). Tal como no Cap. 4 o BbF é o PAH de 5 anéis mais importante em ambos os locais, aumentando nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e diminuindo no transplante inverso, indicando um aumento das características dos mexilhões de Vilamoura (pirolíticas), nos mexilhões de Tavira. Esta tendência também se verifica no aumento de PAHs de 6 anéis, como o BPer e o IndP nestes mesmos indivíduos (Tavira para Vilamoura). Assim, tal como para os *n*-alcanos, a distribuição dos PAHs individuais também se altera, verificando-se nos mexilhões de Tavira o aumento de compostos pirolíticos e diminuição dos petrogénicos, assemelhando-se a indivíduos originários de Vilamoura, enquanto que os indivíduos de Vilamoura quando colocados num local com características petrogénicas, vão adquirindo essas características, como sejam a maior proporção de PAHs de baixo peso molecular. Por outro lado, os indivíduos quando são recolocados nos seus locais de origem, tendem a recuperar as características desse local, pois no dia C60 a proporção relativa dos PAHs parece restabelecer-se, nos mexilhões de ambos os locais.

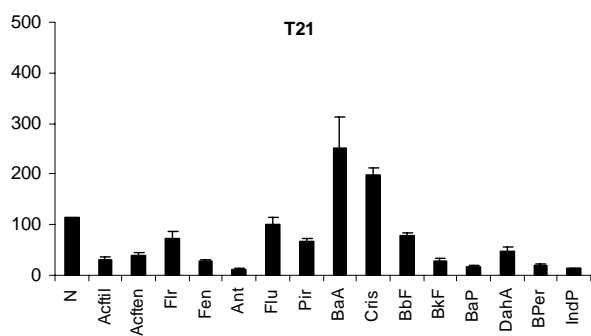
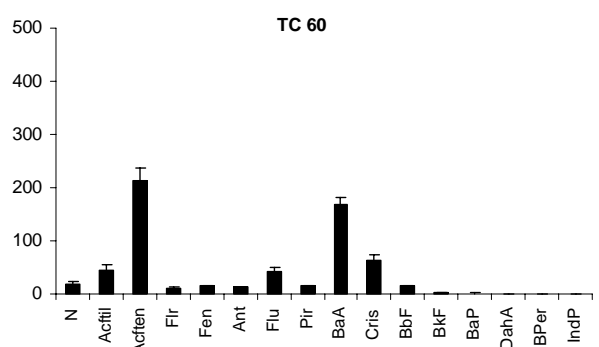
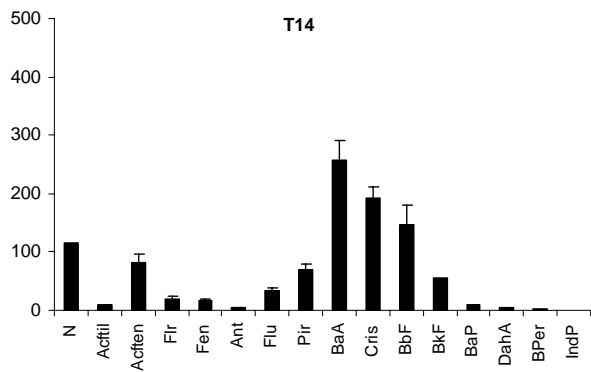
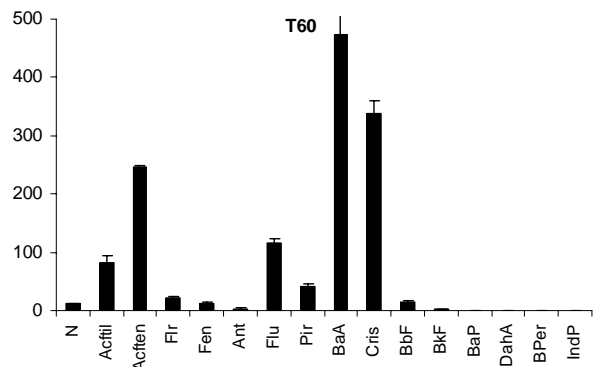
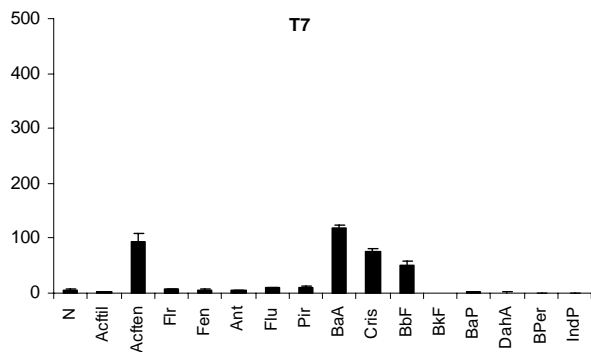
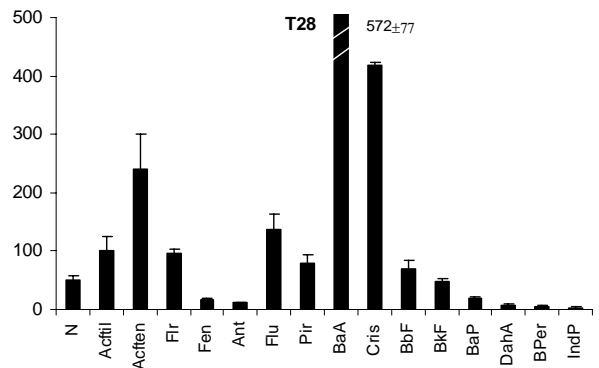
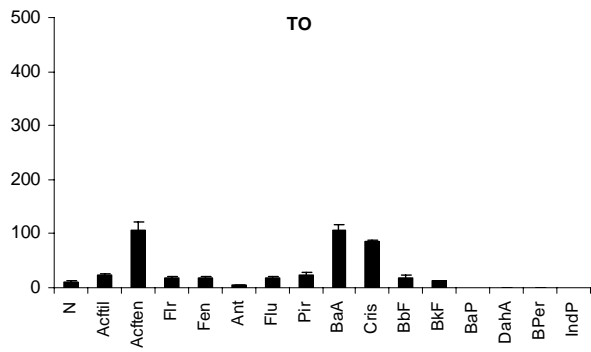


Figura 6.7 - Distribuição da concentração individual de PAHs, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (Abreviaturas dos compostos como na Tab. 6.1).

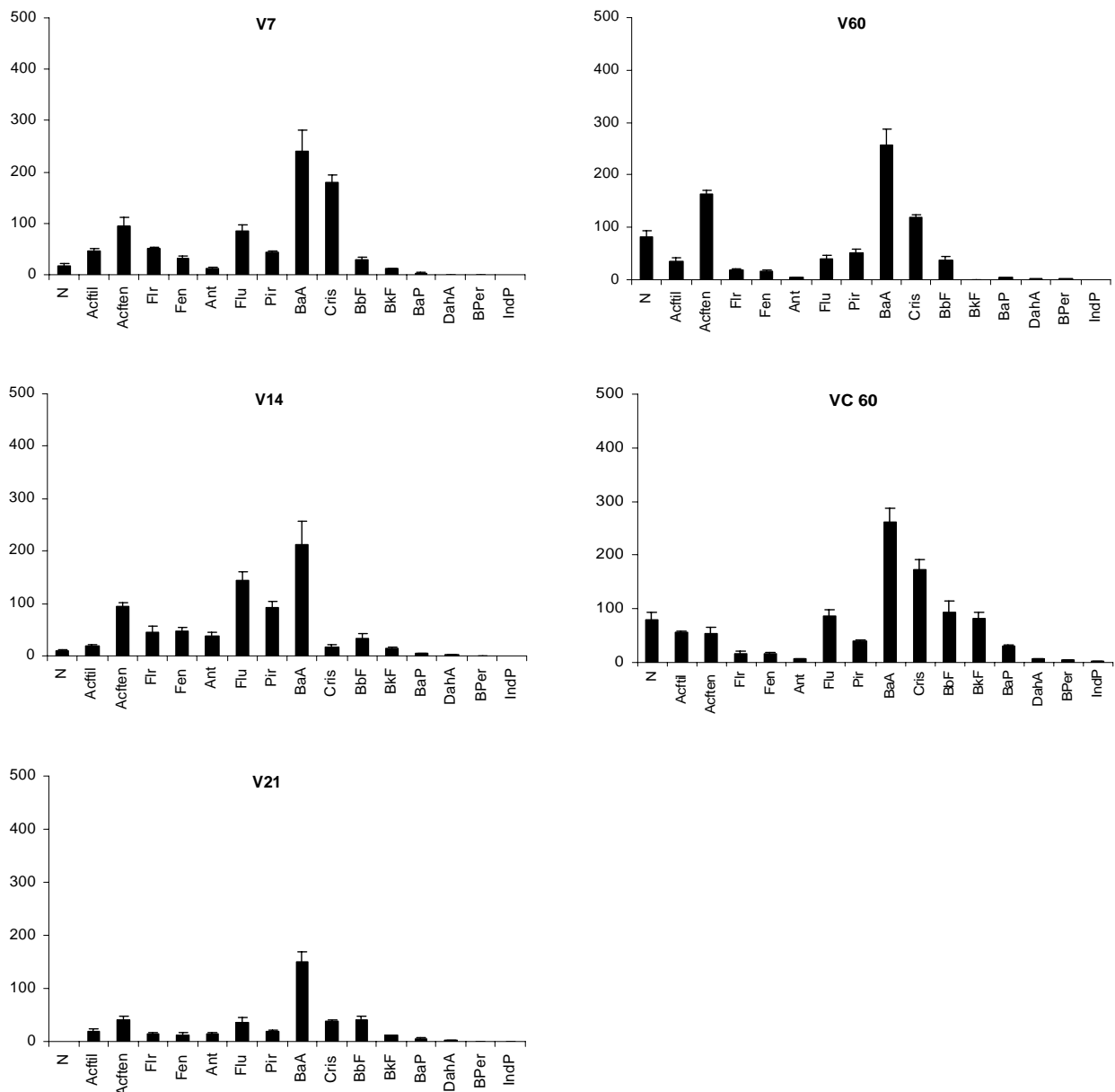


Figura 6.8 - Distribuição da concentração individual de PAHs, em mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira (Abreviaturas dos compostos como na Tab. 6.2).

A análise CCA foi aplicada às concentrações individuais dos 16 PAHs, considerando ambos os transplantes e usando os dados transformados em proporção do total, de modo a melhor se compreender a variação da distribuição dos PAHs ao longo do tempo, como se mostra na Figura 6.9.

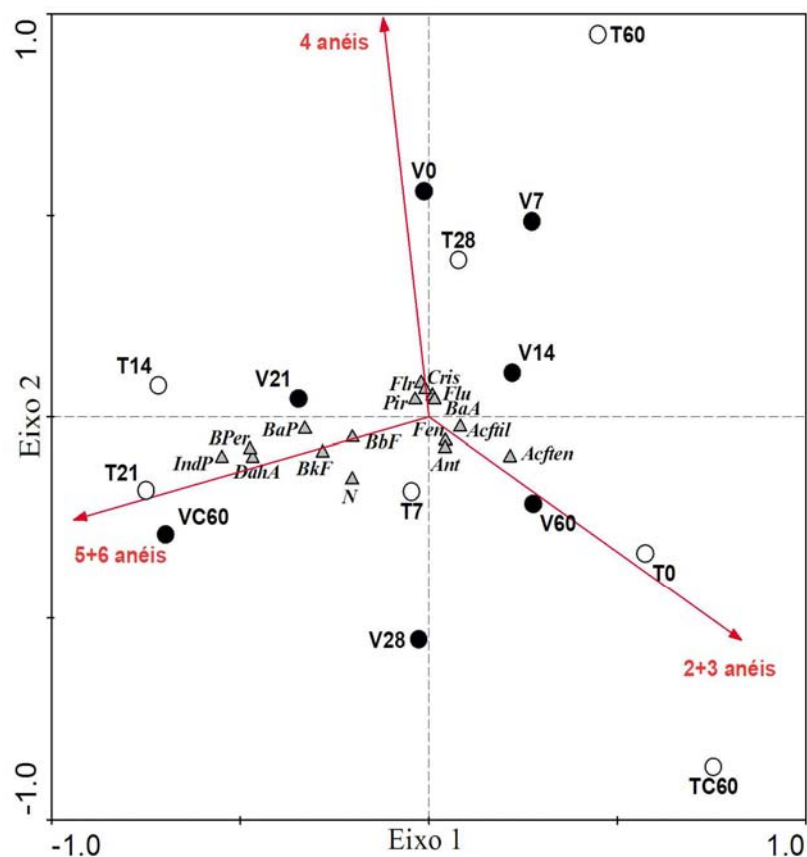


Figura 6.9 - Análise canónica de correspondência (CCA) dos PAHs individuais em relação ao número de anéis, em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V). (abreviaturas dos PAH como nas Tabelas 6.3 e 6.4)

Os eixos 1 e 2 explicam 89 % da variância dos dados, onde o eixo 1 separa os compostos de 4 e 5+6 anéis (zona negativa) dos de 2+3 anéis na (zona positiva), enquanto que o eixo 2 separa os compostos de 4 anéis (zona positiva) e os de 2+3 e de 5+6 (zona negativa), embora o naftaleno apresente concentrações próximas dos compostos de elevado peso molecular.

Quanto aos *scores* dos locais, existe uma certa mistura dos dias de amostragem, como seria de esperar pelas alterações dos perfis individuais dos 16 PAHs ao longo do tempo, na medida em que os mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) nos dias 7, 14 e 21 apresentam uma distribuição de PAHs próximas dos mexilhões de Vilamoura

(VC60), principalmente devido aos PAHs de 5+6 anéis (quadrante inferior esquerdo), enquanto que nos dias 28 e 60 os indivíduos de Tavira apresentam semelhanças com os mexilhões recolhidos em Vilamoura (dia 0), ou seja, com maior teor de PAHs de 4 anéis (quadrante superior direito). Por outro lado, os dois controlos de Tavira (T0 e TC60) são semelhantes, ambos mais relacionados com compostos de 2+3 anéis, sendo as concentrações superiores no dia TC60 (quadrante inferior direito). Quanto aos mexilhões de Vilamoura transplantados para Tavira (V), a alteração da concentração relativa dos PAHs do dia 0 para o dia 7 e 14 é indicada pela influência crescente dos PAHs de 2+3 anéis em detrimento dos PAHs de 4 anéis (quadrante superior direito). No dia 60 (V60) os mexilhões ainda mantêm as características de Tavira, nomeadamente em relação aos PAHs de 2+3 anéis, fazendo com que este ponto se correlacione com os mexilhões de Tavira no dia 0 (T0) (quadrante inferior direito) enquanto que os mexilhões recolhidos em Vilamoura no final (VC60) apresentam as características pirolíticas típicas, com PAHs de 5+6 anéis.

De modo a avaliar a origem e fontes dos PAHs nos tecidos dos mexilhões transplantados foram calculadas várias razões de diagnóstico, cujos resultados se apresentam nas Figuras 6.10 e 6.11 (e Tab. 6.3 e 6.4). A razão Fen/Ant oscilou entre 0,88 e 3,9 indicando fontes pirolíticas (Fen/Ant <10) para ambos os locais e durante o período de transplante, enquanto que a razão Flu/Pir indica a presença de PAHs com características tanto petrogénicas (Flu/Pir <1) como pirolíticas (Flu/Pir >1). Assim, quando se graficam os resultados obtidos para as razões diagnóstico Fen/Ant vs Flu/Pir (Fig. 6.8), verifica-se que ao longo dos transplantes ambos os locais apresentam PAHs com características maioritariamente pirolíticas, enquanto que os mexilhões de Tavira (T) apresentam características mistas nos dias 0, 7 e 14 e Vilamoura (V) no dia 60, ou

seja, apresentam PAHs tanto petrogénicos ($\text{Flu}/\text{Pir} < 1$) como pirolíticos ($\text{Fen}/\text{Ant} < 10$). As mesmas características mistas foram encontradas nestes locais, no estudo anual e no temporal (Cap. 4).

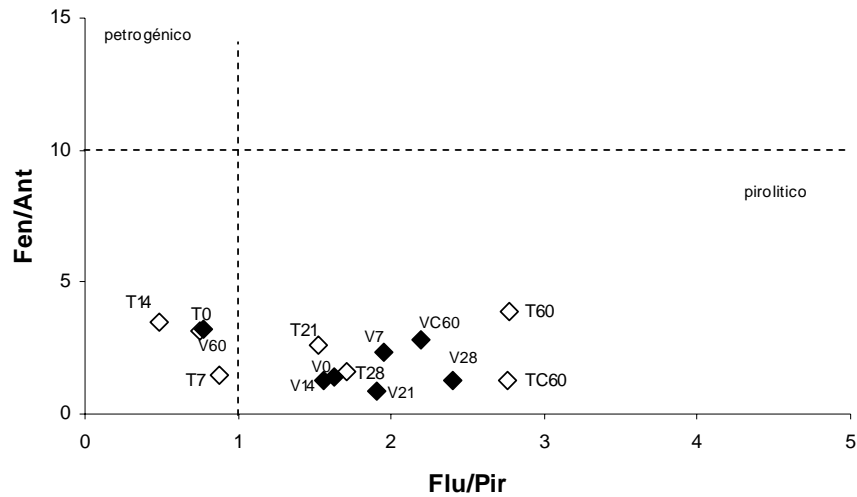


Figura 6.10 - Razão fenantreno/antraceno (Fen/Ant) vs fluoranteno/pireno (Flu/Pir) em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (branco) e de Vilamoura para Tavira (preto).

Para melhor distinguir a origem dos PAHs nos tecidos dos mexilhões, foram calculadas outras razões de isómeros que permitem distinguir entre PAHs pirolíticos com origem nas combustões incompletas de combustíveis fósseis dos PAHs pirolíticos com origem na combustão da biomassa. Tais razões são: $\text{Ant}/\text{Ant}+\text{Fen}$; $\text{BaA}/\text{BaA}+\text{Cris}$; $\text{IndP}/\text{IndP}+\text{BPer}$ e $\text{Flu}/\text{Flu}+\text{Pir}$ (Fig. 6.11; Tabelas 6.3 e 6.4).

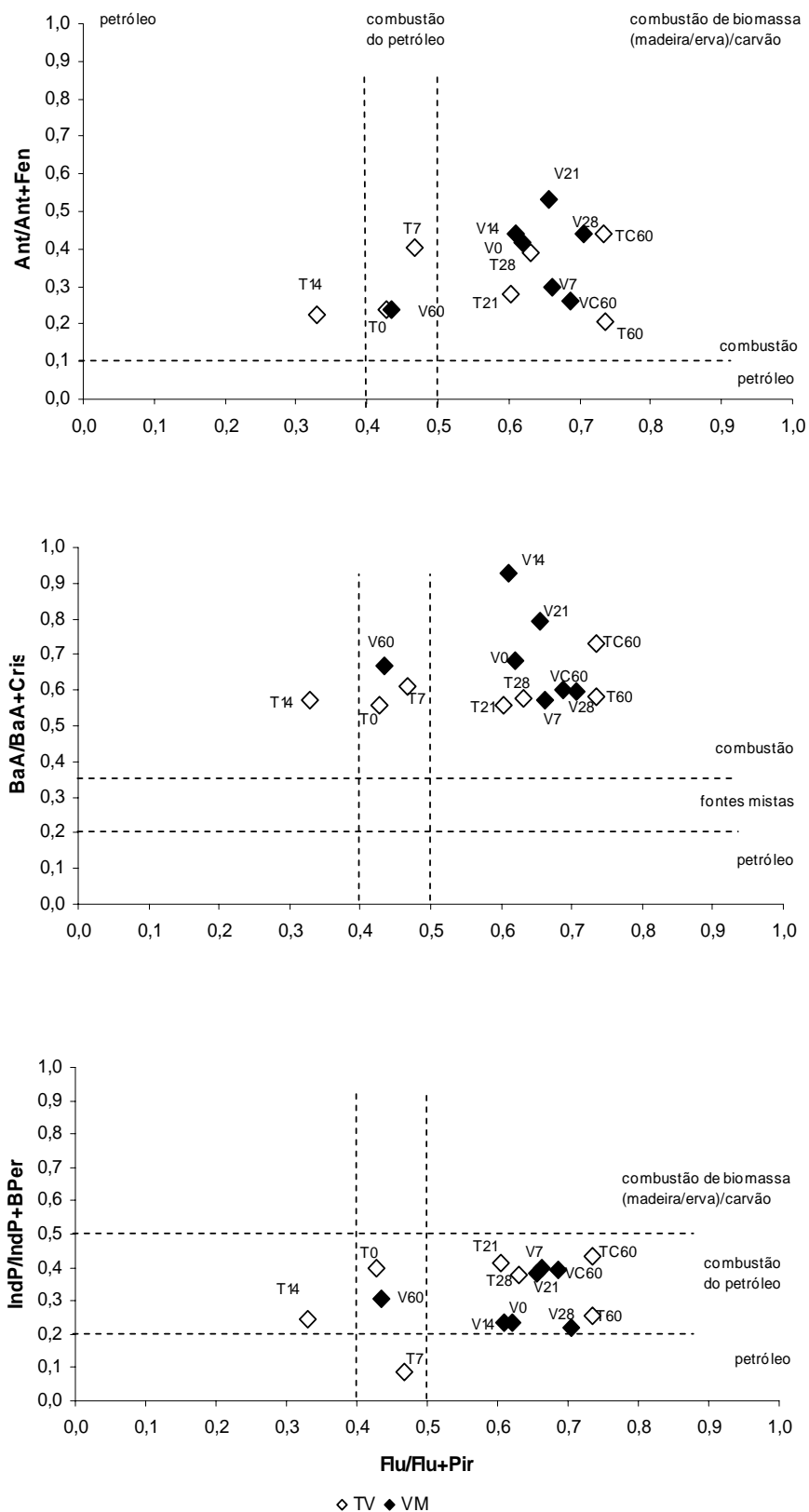


Figura 6.11 - Razões entre $Ant/Ant+Fen$, $BaA/BaA+Cris$ e $IndP/IndP+BPer$ em relação à razão $Flu/Flu+Pir$ em mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (branco) e de Vilamoura para Tavira (preto).

A razão diagnóstica $\text{Ant}/\text{Ant}+\text{Fen}$ mostra que os PAHs acumulados nos mexilhões transplantados derivam de combustão de biomassa (Fig. 6.11). Estes resultados estão em conformidade com o observado na razão Fen/Ant (Fig. 6.10), que também revelou predominância de PAHs pirolíticos. Em ambos os locais, a grande maioria das amostras apresenta valores da razão $\text{Flu}/\text{Flu}+\text{Pir}$ consistente com PAHs emitidos na combustão incompleta de combustíveis fósseis ou numa mistura de PAHs provenientes da combustão de madeira (ou possivelmente conservantes como o creosoto) e/ou carvão, com apenas uma ocorrência de PAHs derivados do petróleo (ou combustíveis) não queimado (T14). A razão $\text{Ant}/\text{Ant}+\text{Fen} > 0,10$ corresponde na maioria dos casos a valores da razão $\text{Flu}/\text{Flu}+\text{Pir} > 0,40$ suportando a conclusão de que os produtos pirolíticos são uma forte componente dos PAHs acumulados pelos mexilhões, quer estejam num local menos contaminado, ou num local mais contaminado. A mesma tendência é verificada pelos resultados das razões $\text{BaA}/\text{BaA}+\text{Cris}$ e $\text{IndP}/\text{IndP}+\text{BPer}$, com PAHs resultantes primariamente da combustão e da combustão de produtos do petróleo.

Assim, os PAHs nos tecidos dos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e *vice-versa* são maioritariamente derivados das combustões incompletas do petróleo e seus derivados ($\text{Ant}/\text{Ant}+\text{Fen}$; $\text{BaA}/\text{BaA}+\text{Cris}$; $\text{IndP}/\text{IndP}+\text{BPer}$), apresentando ainda PAHs petrogénicos (petróleo não queimado) e pirolíticos derivados da queima de biomassa ($\text{Flu}/\text{Flu}+\text{Pir}$). O mesmo tipo de fontes pirolíticas (quer derivadas da combustão de biomassa/carvão, quer da combustão de combustíveis fósseis), e petrogénicas (petróleo, combustíveis não queimados), foram determinadas no Cap. 4, mantendo-se as mesmas fontes de PAHs na costa Sul.

6.3.3 – Sistema MFO

A concentração total de citocromos (CYP450, P418, e Cit b₅), e das actividades das reductases associadas (NADPH-RED e NADH-RED) na fracção microsomal da glândula digestiva de mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura e *vice-versa*, é apresentada na Figura 6.12 e Tabela 6.5. A concentração de base (dia 0) do CYP450 (Fig. 6.10A) é menor em Tavira ($24,1 \pm 3,20$ pmol/mg prot) do que em Vilamoura ($36,6 \pm 5,4$ pmol/mg prot), e diminui ao fim da primeira semana (dia 7 - $19,9 \pm 2,3$ pmol/mg prot) de transplante de Tavira para Vilamoura, aumentando depois até ao dia 28 ($37,2 \pm 3,0$ pmol/mg prot), com uma taxa de incremento de $0,74$ pmol/mg prot/dia ($r=0,94$; $p<0,05$). Quando os mexilhões regressaram a Tavira a concentração total de CYP450 diminuiu 4% (dia 60: $35,5 \pm 1,8$ pmol/mg prot) ($p<0,05$), mas ainda é superior à concentração dos mexilhões autóctones (dia C60: $24,2 \pm 2,7$ pmol/mg prot), cujos níveis são semelhantes aos iniciais. Contrariamente, nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, as concentrações totais de CYP450 diminuem gradualmente do dia 0 ($36,6 \pm 5,4$ pmol/mg prot) para o dia 21 ($26,6 \pm 2,9$ pmol/mg prot) ($p<0,05$), com uma taxa de $0,48$ pmol/mg prot/dia ($r=0,97$; $p<0,05$), aumentando depois para o dia 28 ($31,5 \pm 3,9$ pmol/mg prot). No dia 60 os níveis de CYP450 são 4% inferiores aos do dia 28, e semelhantes ao dos mexilhões autóctones (C60: $38,3 \pm 4,7$ pmol/mg prot). É ainda de salientar que as concentrações de CYP450 são semelhantes em ambos os transplantes, excepto no dia 7 em que as concentrações são superiores nos mexilhões de Vilamoura.

As concentrações do pico “418” (P418) (Fig. 6.12B; Tab. 6.5) são idênticas em ambos os locais e ao longo do tempo, embora nos dias 21 e 28 concentração nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura seja superior à dos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira.

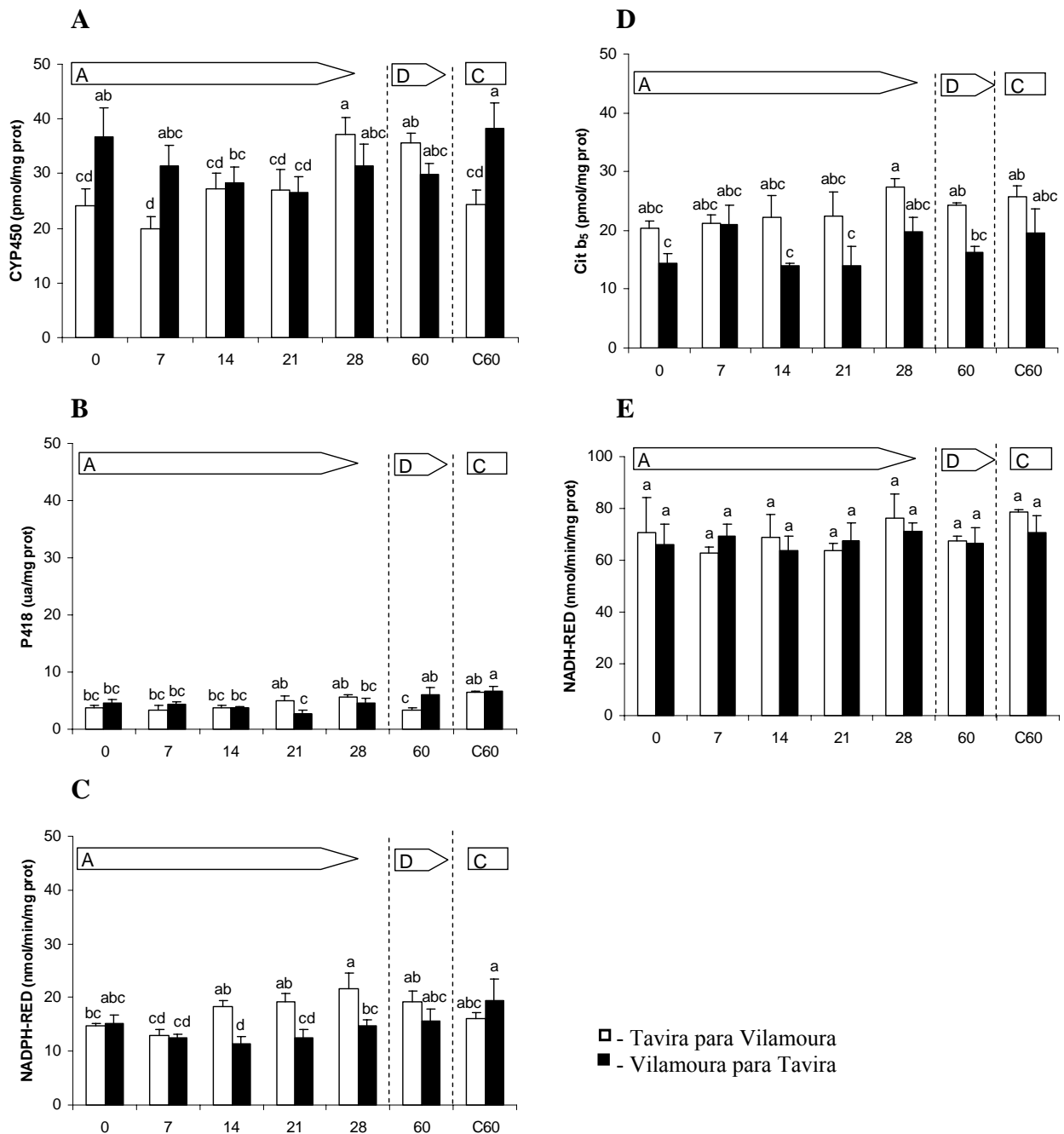


Figura 6.12 - Concentração total de citocromo P450 (A), de P418 (B), e actividade da NADPH-RED (C), concentração de citocromo b₅ (D), e actividade da NADH-RED (E), na fracção microsomal da glândula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* transplantados de Tavira para Vilamoura e de Vilamoura para Tavira. (A – acumulação; D – depuração; C – controlo; média ± desvio padrão; letras diferentes significam diferenças estatísticas; Duncan's test, $p < 0,05$).

Tabela 6.5 - Concentração e actividade dos componentes do sistema MFO, nos ensaios de transplante.

	CYP450 (pmo/mg prot)	P418 (u.a./mg prot)	Cit b₅ (pmol/mg prot)	NADPH-red (nmol/min/mg prot)	NADH-red (nmol/min/mg prot)
Tavira para Vilamoura					
T0	24,1 ± 3,2	3,8 ± 0,4	20,4 ± 1,2	14,7 ± 0,5	70,5 ± 13,8
T7	19,9 ± 2,3	3,4 ± 0,8	21,2 ± 1,5	13,0 ± 1,1	62,9 ± 2,1
T14	27,2 ± 3,0	3,8 ± 0,3	22,2 ± 3,6	18,2 ± 1,3	68,6 ± 9,0
T21	27,0 ± 3,7	5,1 ± 0,8	22,4 ± 4,1	19,2 ± 1,5	63,5 ± 3,0
T28	37,2 ± 3,0	5,6 ± 0,6	27,4 ± 1,5	21,7 ± 2,8	76,3 ± 9,2
T60	35,5 ± 1,8	3,4 ± 0,4	24,4 ± 0,4	19,3 ± 1,8	67,3 ± 1,8
TC60	24,2 ± 2,7	6,4 ± 0,3	25,7 ± 1,8	16,0 ± 1,1	78,6 ± 1,1
Vilamoura para Tavira					
V0	36,6 ± 5,4	4,5 ± 0,7	14,4 ± 1,6	15,2 ± 1,5	65,9 ± 7,9
V7	31,3 ± 3,9	4,4 ± 0,5	20,9 ± 3,4	12,6 ± 0,6	69,2 ± 4,7
V14	28,4 ± 2,7	3,8 ± 0,1	13,9 ± 0,4	11,5 ± 1,3	63,7 ± 5,7
V21	26,6 ± 2,9	2,7 ± 0,6	14,1 ± 3,2	12,5 ± 1,5	67,2 ± 7,4
V28	31,5 ± 3,9	4,7 ± 0,8	19,8 ± 2,5	14,8 ± 1,0	71,3 ± 3,2
V60	29,9 ± 1,8	6,1 ± 1,2	16,3 ± 1,0	15,6 ± 2,3	66,3 ± 6,1
VC60	38,3 ± 4,7	6,7 ± 0,7	19,5 ± 4,1	19,3 ± 4,2	70,7 ± 6,5

O padrão de distribuição da actividade da NADPH-citocromo *c* reductase (NADPH-RED) (Fig. 6.12C; Tab. 6.5) nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura, acompanha o padrão do CYP450 ou seja, mantém-se do dia 0 para o dia 7, aumentando depois até ao dia 28 para níveis semelhantes, decrescendo de novo quando os indivíduos regressam ao local de origem. A actividade da NADPH-RED nos mexilhões autóctones é semelhante. Quando os mexilhões são transplantados de Vilamoura para Tavira a actividade da NADPH-RED não se altera, embora a actividade seja menor nos dias 7, 14 e 21, relativamente aos organismos autóctones (dia C60). Este padrão é semelhante ao padrão de CYP450 nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira. De referir ainda que a actividade da NADPH-RED é semelhante nos dois locais de origem e é superior nos mexilhões de transplantados de Tavira para Vilamoura nos dias 14, 21 e 28.

A concentração de citocromo b₅ (Fig. 6.12D; Tab. 6.5), não apresenta diferenças significativas nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (entre 20,42±1,17 e 27,36±1,5 pmol/mg prot), nem no transplante inverso (entre 13,93±0,45 e 20,94±3,38

pmol/mg prot), embora haja um aumento nos dias 7 e 28 nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira. A actividade da NADH-citocromo b₅ reductase (NADH-RED) (Fig. 6.12E; Tab. 6.5) dos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, e nos mexilhões transplantados de modo inverso não variou ao longo do tempo, sendo a actividade desta enzima idêntica em ambos os locais.

Para analisar as alterações verificadas nos componentes do sistema MFO nos mexilhões transplantados, foi efectuada a análise dos componentes principais aos dados de ambos os locais, como se mostra na Figura 6.13. Os eixos 1 e 2 explicam 84% da variância dos dados, separando o transplante de Tavira em Vilamoura (T) na zona positiva do eixo 2 e o transplante de Vilamoura para Tavira (V) na zona negativa. Os componentes do sistema MFO estão associados à zona positiva do eixo 1, encontrando-se ainda o CYP450 na zona negativa do eixo 2 (quadrante inferior direito), mais relacionado com VC60, e o citocromo b₅ e a NADH-RED na zona negativa do eixo 2 (quadrante superior direito), relacionado com os mexilhões de Tavira.

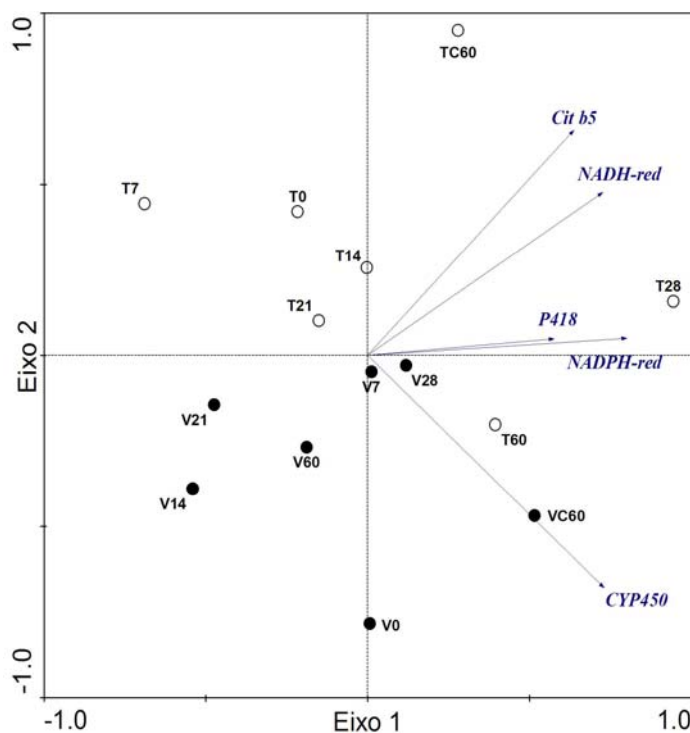


Figura 6.13 - Análise dos componentes principais (PCA) dos componentes do sistema MFO na glândula digestiva de mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (T) e de Vilamoura para Tavira (V).

6.3.4 – Relação entre o CYP450 e os hidrocarbonetos

Tal como no Cap. 5, neste Capítulo também se estudou a relação entre o citocromo P450 (e restantes componentes do sistema MFO), analisado na glândula digestiva, e a concentração total de hidrocarbonetos (HAs e PAHs) acumulados nos tecidos dos mexilhões, pela análise de regressão, nos dois transplantes em simultâneo e separadamente.

Os resultados revelam uma relação significativa entre o CYP450 e os TPAH quer quando são usados todos os dados em simultâneo, quer quando se separam os dados por transplante (Fig. 6.14), mas não com a concentração de TAlc em qualquer dos casos.

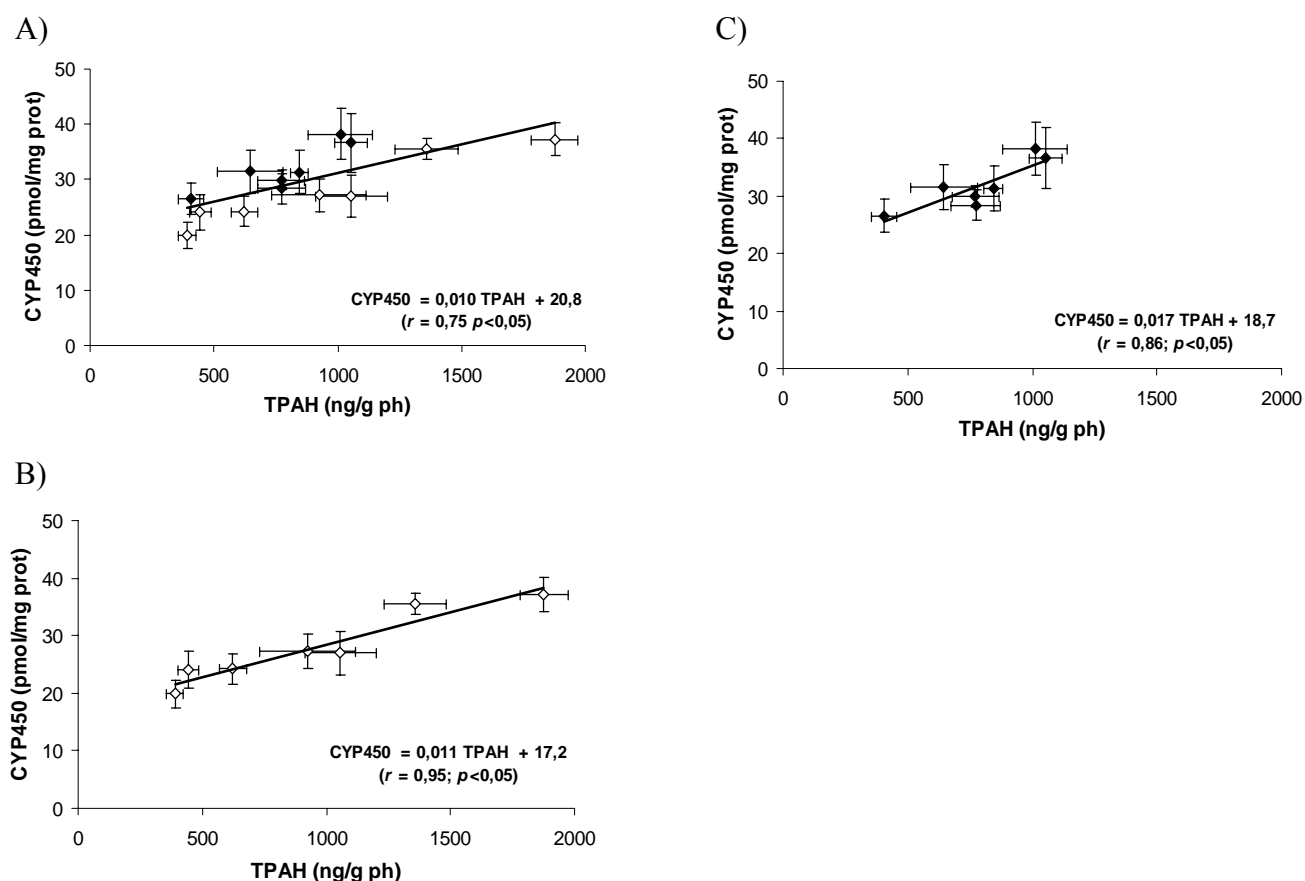


Figura 6.14 - Relação entre a concentração de CYP450 e a concentração de TPAH, nos dois transplantes (A), no transplante de Tavira para Vilamoura (B) e no transplante inverso (C).

O CYP450 tem ainda uma relação positiva com a UCM, mas apenas quando se analisa os dois transplantes em simultâneo ($r=0,59$; $p<0,05$). Das restantes componentes do sistema MFO, somente a NADPH-red se relaciona com a concentração de TPAH, no conjunto ($r=0,78$; $p<0,05$) e nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura ($r=0,95$; $p<0,05$), e com os TAlc no transplante de Tavira para Vilamoura ($r=0,86$; $p<0,05$). O citocromo b5 e a NADH-red não se relacionam com os hidrocarbonetos, em nenhuma das situações.

De modo a avaliar qual dos PAHs individuais tem maior influência na concentração de CYP450 utilizou-se a análise CCA, na qual os hidrocarbonetos HAs e PAHs individuais são expressos em termos de proporção da concentração total, utilizando-se os TAlc e os TPAH em separado (Fig. 6.15 A e B) e em conjunto (Fig. 6.15 C), considerando os dois transplantes em simultâneo.

No primeiro caso (eixo 1 e 2 explicam 81% da variância dos dados) (Fig. 6.15 A), os *n*-alcanos de elevado peso molecular (C24-C36) e o transplante de Vilamoura para Tavira (eixo -1) são separados dos isoprenoides e *n*-alcanos de peso molecular menor (C14-C23) e do transplante de Tavira para Vilamoura, que se projectam no eixo (+1). O CYP450 e o P418 são superiores nos dias V0 e VC60, enquanto que a NADPH-red apresenta actividades superiores no dia T28 e VC60, relacionando-se com os *n*-alcanos de elevado peso molecular, tal como no Cap. 5.

Quando se analisa só os PAHs individuais (eixos 1 e 2 explicam 70% da variância) (Fig. 6.15 B), há também uma separação entre os transplantes, projectando-se o transplante de Tavira para Vilamoura no eixo (+2) e o inverso no eixo (-2). O incremento da concentração de PAHs pirolíticos de 4, 5 e 6 anéis nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura projecta os pontos T14, T21 e T28 no quadrante superior

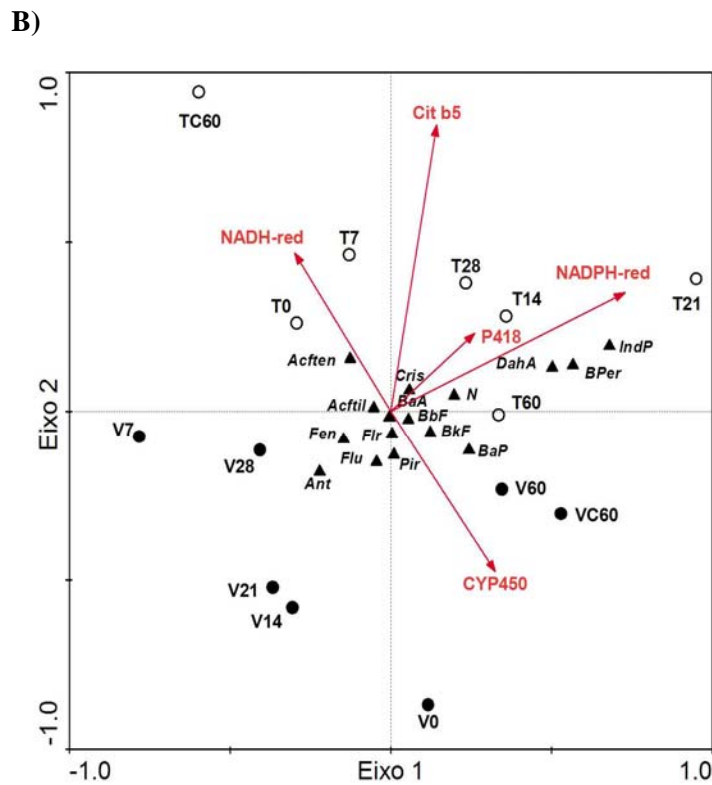
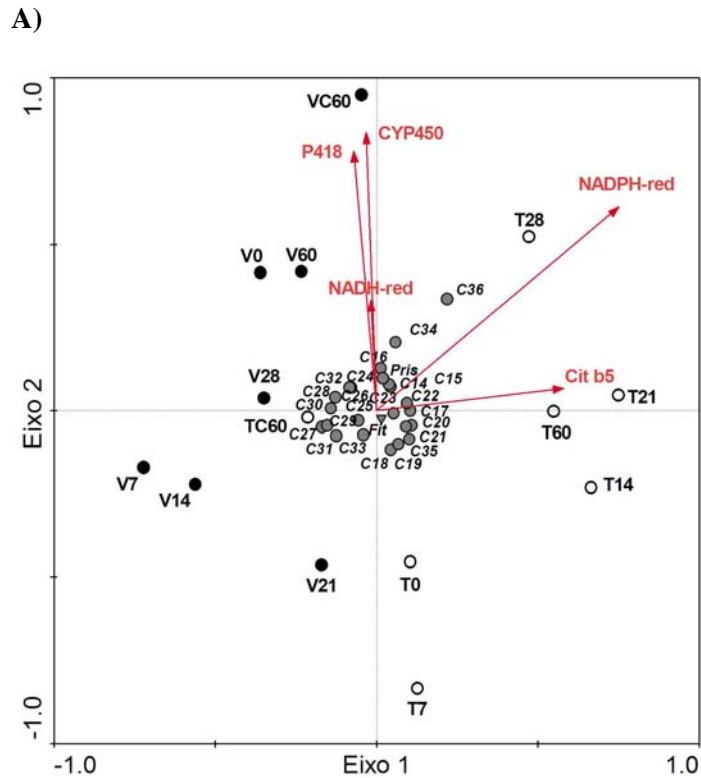


Figura 6.15 - Análise canônica de correspondência (CCA) entre os componentes do sistema MFO e as concentrações individuais de hidrocarbonetos *n*-alcanos (A), PAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando ambos os transplantes. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 6.1 e 6.3).

C)

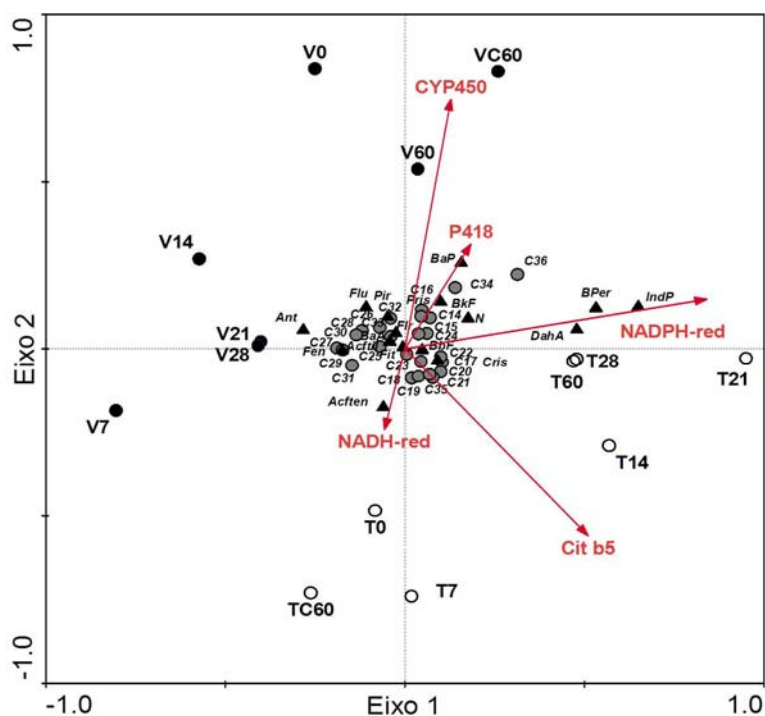


Figura 6.15 (Continuação) - Análise canônica de correspondência (CCA) entre os componentes do sistema MFO e as concentrações individuais de hidrocarbonetos *n*-alcanos (A), PAHs (B) e os dois tipos de hidrocarbonetos em simultâneo (C), considerando ambos os transplantes. (hidrocarbonetos como proporção do total; legenda dos compostos como nas Tab. 6.1 e 6.3).

direito, relacionado também com o incremento da concentração de citocromo b_5 e da actividade da NADH-red. O CYP450 relaciona-se com o aumento dos PAHs de elevado peso molecular, principalmente o BbF, BbK e o BaP cujas concentrações individuais são superiores nos dias V60 e VC60 relativamente aos dias T60 e TC60.

Quando se analisam os hidrocarbonetos em simultâneo (Fig. 6.15 C) (os eixos 1 e 2 explicam 67% da variância dos dados), verifica-se que a projecção dos *n*-alcanos e dos PAHs individuais é idêntica, na qual também se mantém a separação do dois transplantes.

6.4 - DISCUSSÃO

Mexilhões de um local considerado relativamente limpo (Tavira) foram colocados num local contaminado (Vilamoura), durante um mês, com recolhas semanais. No final deste período, procedeu-se à recolocação de um outro conjunto de mexilhões no local de origem, que foi recolhido um mês depois (dia 60). Durante este período de 60 dias, foram recolhidos mexilhões autóctones (dois controlos), um no dia 0 e outro no final do ensaio (C60). O transplante inverso foi executado de igual modo, com mexilhões de Vilamoura transplantados para Tavira.

A concentração de hidrocarbonetos do petróleo TAlc, UCM e TPAH analisados nos tecidos dos mexilhões transplantados de Tavira e de Vilamoura no início e no fim do ensaio (dias 0 e C60) são da mesma ordem de grandeza das concentrações de TAlc, UCM e TPAH detectadas nos mexilhões desses locais ao longo do estudo anual e temporal (Cap. 3 e 4), mas apresentam uma tendência decrescente. Este decréscimo dos níveis de hidrocarbonetos acumulados nos tecidos dos mexilhões, parece reflectir uma melhoria generalizada das condições ambientais na costa Sul. No entanto, as concentrações de hidrocarbonetos do petróleo acumuladas nos mexilhões são superiores em Vilamoura relativamente a Tavira ($p < 0,05$), como também ocorrido anteriormente, indicando que Vilamoura continua a ser o local mais contaminado por hidrocarbonetos do petróleo (Cap. 3 e 4).

TAlc e UCM

Durante as quatro semanas de transplante, a concentração de hidrocarbonetos alifáticos (Fig. 6.1A) nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura apresentam um aumento crescente tanto dos *n*-alcanos pares como dos ímpares (Tab. 6.1, Fig. 6.2),

atingindo dia 28 uma concentração 6 vezes superior à concentração inicial, embora os *n*-alcanos pares e os isoprenoides, característicos de fontes petrolíferas, tenham maior incremento, com o conseqüente decréscimo do CPI. Apesar da alteração do perfil dos *n*-alcanos indicando fontes petrogénicas, houve também um aumento de *n*-alcanos ímpares (C17, C27 e C29). Estes *n*-alcanos são considerados biogénicos, uma vez que o C17 é típico de *n*-alcanos sintetizados por fitoplâncton, enquanto que os *n*-alcanos C27 e C29 são sintetizados pelas plantas superiores terrestres (Wetzel e van Vleet, 2004). Os *n*-alcanos marinhos e terrestres podem ser acumulados através das microalgas e das partículas que os mexilhões filtram para a sua alimentação. Assim, quando os mexilhões de um local menos contaminado (Tavira) são transplantados para um local mais contaminado (Vilamoura) há um aumento dos níveis de hidrocarbonetos totais (com uma taxa de 0,39 µg/g/dia) com uma alteração no perfil dos *n*-alcanos individuais para perfis que se assemelham aos perfis típicos de Vilamoura (petrogénicos com *inputs* marinhos). Os níveis de UCM nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura também aumentam até ao dia 28 (com uma taxa de incremento de 2,4 µg/g/dia), atingindo concentrações cerca de 4,4 vezes superiores às iniciais, indicando a presença de óleos/petróleo degradados. A proporção UCM/TAlc nestes organismos é relativamente baixa, indicando fontes recentes de hidrocarbonetos, com degradação ambiental relativamente baixa. Os resultados obtidos neste ensaio de transplante estão de acordo com um transplante realizado no mar Adriático em que mexilhões *M. galloprovincialis* foram colocados nos canais de Veneza durante 3 semanas, tendo-se verificado um aumento generalizado das concentrações de hidrocarbonetos alifáticos totais (7 vezes superiores aos níveis de base), principalmente dos *n*-alcanos pares de elevado peso molecular, e CPI próximo da unidade (petróleo e produtos petrolíferos), cujo perfil individual se assemelhava com o perfil registado nos sedimentos (Wetzel e

van Vleet, 2004). Durante o período de recuperação a concentração de TAlc e UCM nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura e recolocados de novo em Tavira (dia 60) mostra uma diminuição do teor em hidrocarbonetos de 40 e 60%, respectivamente, indicando uma rápida eliminação dos hidrocarbonetos acumulados para níveis semelhantes aos dos mexilhões autóctones, mantendo algumas características dos mexilhões provenientes de Vilamoura e adquirindo novamente características do local de origem.

No que diz respeito aos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, a concentração de TAlc e UCM decrescem respectivamente 0,57 e 2,6 $\mu\text{g/g/dia}$, (Fig. 6.1) até atingir no dia 21 cerca de metade da concentração inicial ($p < 0,05$). Assim, ao serem colocados num ambiente com menores níveis de hidrocarbonetos, os mexilhões de Vilamoura reduzem os teores de TAlc e UCM acumulados nos seus tecidos. Resultados de recuperação semelhantes foram descritos por Orbea *et al.* (2000) e por Da Ros *et al.* (2000) em transplantes de mexilhões de locais contaminados para locais mais limpos, na Baía da Biscaia e na Lagoa de Veneza. Embora o aumento de TAlc e UCM no dia 28 nos mexilhões de Vilamoura colocados em Tavira pareça indicar que houve um aumento da concentração ambiental de hidrocarbonetos do petróleo em Tavira nesta semana, esse aumento não se veio a observar nos indivíduos de Tavira autóctones recolhidos no dia 60 (C60). De facto, o ensaio de transplante decorreu entre Junho e Agosto, período de maior actividade náutica costeira (podendo aumentar a concentração de hidrocarbonetos na água, sedimentos e organismos). Nesta estação do ano podem ocorrer posturas ocasionais, que podem levar à diminuição de hidrocarbonetos nos tecidos. Relativamente à distribuição dos *n*-alcanos individuais e isoprenoides (Tab. 6.2; Fig. 6.4), os mexilhões de Vilamoura transplantados para Tavira apresentam na segunda semana de transplante um predomínio de *n*-alcanos de elevado peso molecular (C26-

C33), essencialmente C27, C29 e C31, característicos de plantas superiores terrestres. Esta predominância repete-se no dia 28, existindo um aumento dos *n*-alcanos pares (entre o C22 e o C30), indicadores de fontes petrogénicas, que também se reflecte no valor de CPI, que aumenta (do dia 21 para o dia 28) para valores próximos da unidade (CPI=1 para óleos/petróleos). A razão C17/C29 nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira é sempre inferior a 1, confirmando um contributo maior de *n*-alcanos biogénicos terrestres (C29) do que marinhos (C17). Assim, para além da diminuição das concentrações totais de TAlc e UCM nos tecidos dos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, parece também existir uma mudança na assinatura de *n*-alcanos, nomeadamente dos compostos com origem nas plantas superiores terrestres.

O comportamento diferente entre os dois transplantes é visível na análise CCA (Fig. 6.4) efectuada ao conjunto de dados obtido, que separa os dois transplantes em zonas distintas, quer devido à diferença entre as concentrações de TAlc entre os mexilhões de Tavira e os de Vilamoura, quer devido à distribuição dos *n*-alcanos e às razões e índices calculados. De facto, os *n*-alcanos de baixo peso molecular e os isoprenoides são projectados no eixo (+1), com a maioria dos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, enquanto que os de elevado peso molecular se projectam no eixo (-1), com o transplante dos mexilhões de Vilamoura para Tavira.

PAHs

A concentração de TPAH nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura aumentou a partir da primeira semana de ensaio, com uma taxa de incremento de 65,7 ng/g/dia, atingindo concentrações cerca de 4 vezes superiores às do dia 0 no dia 28. Durante este período, o perfil individual dos PAHs modificou-se, com o aumento de

PAHs de 4, 5 e 6 anéis, típicos da combustão de produtos do petróleo em detrimento dos PAHs de 2 e 3 anéis, típicos de petróleo e produtos petrolíferos não queimados. As concentrações de acenaftileno, acenafteno e fluoreno diminuíram durante as primeiras três semanas, voltando a aumentar no dia 28, enquanto que as concentrações de fenantreno e antraceno se mantêm inalteradas durante o transplante. Por outro lado, houve uma acumulação de PAHs de peso molecular superior como o fluoranteno, o benzo(a)antraceno e o criseno, que atingem a concentração máxima no dia 28, e ainda um aumento de PAHs de 5 e 6 anéis (do dia 21 ao 28), essencialmente devido ao aumento da concentração de BbF, BPer e IndP. Este tipo de alterações, nas concentrações totais e nos perfis de distribuição dos PAHs individuais, foram também encontradas por Wetzel e van Vleet (2004) no transplante de mexilhões *M. galloprovincialis* efectuado no mar Adriático para os canais interiores de Veneza, que indicam a presença de PAHs petrogénicos e maior acumulação de PAHs pirolíticos, provenientes do intenso tráfego marítimo. Damiens *et al.* (2007) e Fabri *et al.* (2006) detectaram resultados semelhantes, respectivamente em transplantes de mexilhões de um local limpo da Baía de Cannes para um mais contaminado, e de um local limpo no Mar Adriático para a laguna costeira de Pialassa Baiona (Ravenna, Itália) contaminada com PAHs pirolíticos. De modo idêntico, mexilhões de um local limpo transplantados na Baía da Biscaia para locais mais contaminados durante 3-6 semanas, verificou-se um aumento nas concentrações de PAHs nos tecidos dos mexilhões transplantados (Orbea *et al.*, 2000). Por outro lado, na Baía de Hong Kong também se verificou um aumento da concentração de TPAHs em mexilhões *Perna viridis* transplantados de um local remoto para locais contaminados com hidrocarbonetos (Cheung *et al.*, 2001), embora a distribuição individual de PAHs não tenha sido estudada. Os níveis de TPAH acumulados neste período de tempo diminuíram 27% quando os mexilhões foram

recolocados no local de origem, mostrando sinais de recuperação, sendo no entanto a depuração mais lenta que a acumulação.

Relativamente aos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, as concentrações de TPAH diminuem do dia 0 para o dia 21, com uma taxa de 28,6 ng/g/dia indicando uma eliminação dos PAHs quando são colocados num local mais limpo, como também verificado por Orbea *et al* (2000) em mexilhões *M. galloprovincialis* transplantados na Baía da Biscaia.

De um modo semelhante, quando mexilhões *Geukensia demissa* foram transplantados de um local cronicamente contaminado com produtos do petróleo para um local mais limpo, verificou-se uma diminuição de TPAH nos tecidos dos mexilhões, acompanhada de uma melhoria das taxas de crescimento e de filtração, mas não no índice de condição (Culbertson *et al.*, 2008). Quanto ao perfil individual de PAHs, este não se altera durante as primeiras 2 semanas de transplante, embora se verifique um aumento das concentrações de PAHs de baixo peso molecular, característicos de fontes petrolíferas, nomeadamente o acenafteno, fenantreno e antraceno. Contrariamente, as concentrações de BaA e do Cris diminuem ao longo do transplante, enquanto que os PAHs de 5 anéis atingem valores mais elevados no dia 28. Os PAHs de 6 anéis estão presentes em concentrações muito reduzidas, diminuindo ao longo do tempo. Parece portanto que nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira, além de se verificar uma eliminação nos níveis de TPAH, o perfil de distribuição individual também se altera, como verificado para a distribuição dos *n*-alcanos, com o aumento de PAHs de baixo peso molecular característico de Tavira, e progressiva diminuição dos PAHs de elevado peso molecular (4, 5 e 6 anéis), essencialmente pirolíticos, característicos de Vilamoura. Vilamoura é o local onde se situa a maior marina de recreio do Algarve, com intenso tráfego principalmente no Verão, apresentando os mexilhões deste local elevadas

proporções de PAHs de origem na combustão do petróleo, e característicos de produtos petrolíferos não queimados (gasolina, gasóleo). Contrariamente, em Tavira existe um pequeno porto de pesca e embora se verifique um aumento das actividades náuticas no Verão com aumento de PAHs pirolíticos, os PAHs de baixo peso molecular representam uma parte significativa dos PAH totais. Ao transplantar mexilhões de Vilamoura (mais contaminado) para Tavira (mais limpo), verificou-se uma alteração gradual do perfil de distribuição dos PAHs individuais, de pirolítico com inputs petrogénicos, para um perfil com características pirolíticas mais suaves e maior proporção petrogénica (óleos e combustíveis). Quando os mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira são recolocados em Vilamoura novamente (V60), verifica-se uma acumulação de TPAH cuja concentração é 17% superior à registada no final do período de transplante.

Assim, parece que a taxa de acumulação de TPAH (Tavira para Vilamoura) é superior à taxa de eliminação (Vilamoura para Tavira). Durante o período em que os mexilhões voltaram para os locais de origem, houve eliminação dos teores acumulados (Tavira). Em geral, as taxas de acumulação de TPAH em mexilhões é rápida, enquanto que a cinética de eliminação é lenta e pode demorar semanas ou meses, dependendo tanto de factores bióticos como abióticos (Neff, 2002). Num estudo efectuado com mexilhões *Mytilus edulis* transferidos de um local limpo para um local contaminado com PAHs e de novo para o local original, os mexilhões foram capazes de eliminar até cerca de 90% dos hidrocarbonetos aromáticos acumulados nos tecidos. No transplante inverso (mais contaminado para mais limpo) a depuração somente atingiu os 40-50% (DiSalvo *et al.*, 1985). Os autores concluem que a exposição crónica a produtos do petróleo pode prejudicar irreversivelmente a sua capacidade de depuração. Do mesmo modo Francioni *et al.* (2007) verificaram um decréscimo de 75% da concentração de TPAH após três meses de transplante de mexilhões *Perna viridis* de um local contaminado na Baía de

Guanabara (Rio de Janeiro), para um local não contaminado, enquanto que no transplante inverso, a concentração de TPAH aumentou para níveis três vezes superiores aos iniciais, onde ocorreu também a alteração dos perfis individuais de PAHs, de características petrogénicas para pirolíticas.

Sistema MFO

De um modo geral a concentração e a actividade dos componentes do sistema MFO estão de acordo com as determinadas no Cap. 5 e as referidas na bibliografia, tanto para locais relativamente limpos, como para locais contaminados.

Nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura (Fig. 6.12) registou-se um aumento de 64% da concentração de CYP450 do início ao fim do ensaio (dia 28), com uma taxa de 0,75 pmol/dia, confirmando a indução deste sistema na presença de hidrocarbonetos, e a capacidade de resposta por parte dos mexilhões ao aumento da contaminação ambiental. A concentração de CYP450 apresenta uma relação significativa com a concentração de TPAH (Fig. 6.14) e parece estar mais relacionada com os *n*-alcanos e PAHs de elevado peso molecular (Fig. 6.15). Na bibliografia não foram encontrados estudos relativos à variação do CYP450 em estudos de transplante, mas Förlin *et al.* (1996) verificaram um aumento 2 a 3 vezes superiores da actividade da enzima benzo(a)pireno hidroxilase (BPH) (mediada pelo CYP450) em mexilhões *M. edulis* transplantados de um local limpo (Ilhas Faroe) para um local contaminado com PAHs (Skagerrak, Mar do Norte), simultâneo ao aumento dos teores totais de PAHs para concentrações 2,5 vezes superiores. Do mesmo modo Shaw *et al.* (2002) verificaram o aumento dos níveis da proteína CYP1A (1,4 vezes) e de dano ao DNA (1,2 vezes) no Reino Unido, em mexilhões *M. edulis* transplantados de Port Quin (local

de referência) para New Brighton (local urbano/industrial com níveis elevados de PAHs e PCBs) após 13 semanas.

Nos mexilhões transplantados de Vilamoura para Tavira registou-se um decréscimo da concentração de CYP450 durante os 28 dias de ensaio, com uma taxa de 0,47 pmol/dia, consistente também com o decréscimo da concentração de hidrocarbonetos, indicando uma adaptação do sistema a níveis menores de contaminação. Neste ensaio, também se regista uma relação significativa entre a concentração de CYP450 e a concentração de TPAH (Fig. 6.14), tal como verificado anteriormente e no Cap. 5, assim como a associação a hidrocarbonetos de elevado peso molecular (Fig. 6.15).

O citocromo b_5 , contrariamente às restantes componentes do sistema MFO, está principalmente relacionado com a oxidação de vários substratos endógenos (Solé *et al.*, 1995), pelo que as diferenças observadas relativas a este parâmetro podem estar relacionadas com o estado metabólico e/ou hormonal dos indivíduos, ou alterações provocadas pela deslocação para locais diferentes. Os mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura apresentam um ligeiro aumento da concentração de citocromo b_5 ao longo do tempo, sendo quase sempre superior à concentração nos mexilhões do transplante inverso (Fig. 6.12 D) embora em nenhum dos casos tenha havido uma relação significativa com os teores de hidrocarbonetos nos tecidos. A oscilação verificada pode por isso estar relacionada com factores abióticos ou intrínsecos ao metabolismo de compostos endógenos. O aumento da actividade da NADPH-citocromo c reductase com o aumento da concentração de PAH está bem documentado na bibliografia (Porte *et al.*, 1991; Solé *et al.*, 1995; Porte *et al.*, 2000) e foi verificado também no Cap. 5. A actividade da NADPH-RED parece ser induzida nos mexilhões de Tavira colocados em Vilamoura, tal como o CYP450, enquanto que no transplante

inverso não sofreu alterações significativas. Ao longo do transplante cruzado, a actividade da NADH-red não é afectada.

6.5 – CONCLUSÕES

Quando transplantados de um local mais limpo para um local contaminado, os mexilhões acumulam hidrocarbonetos alifáticos e UCM que podem atingir, respectivamente, concentrações 6 a 4 vezes superiores à concentração de base, diminuindo depois em 40 e 60%, respectivamente, quando são colocados no local de origem. Por outro lado, os mexilhões eliminam os teores de hidrocarbonetos acumulados nos tecidos quando transferidos de um local contaminado para um local limpo, podendo o decréscimo atingir cerca de 50% da concentração de base.

O perfil individual da distribuição de *n*-alcanos altera-se consoante o ensaio, havendo um incremento de *n*-alcanos pares e biogénicos marinhos nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura ($C_{17}/C_{29} > 1$) e um incremento de *n*-alcanos terrestres no transplante inverso ($C_{17}/C_{29} < 1$). A razão UCM/TAlc em ambos os ensaios revela contaminações recentes, de origem petrolífera ($CPI \approx 1$) com degradação ambiental reduzida dos *n*-alcanos lineares relativamente aos ramificados ($C_{17}/Pris$ e $C_{18}/Fit \leq 1$) indicando a presença de crónica de óleo/petróleo.

Os níveis de TPAH aumentam nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura cerca de 4 vezes diminuindo 27% depois de um período de um mês no local de origem. No ensaio inverso regista-se a diminuição dos teores de TPAH para níveis cerca 2,5

vezes menores, que depois de um mês no local de origem atingem uma concentração semelhante à inicial. Assim, a acumulação de PAHs é também mais rápida que a sua depuração, tal como ocorrido para a fracção alifática.

O perfil da distribuição individual dos PAHs também sofre oscilações, com o incremento de PAHs pirolíticos de 4, 5 e 6 anéis nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, e o aumento da concentração de PAHs petrogénicos de 2 e 3 anéis nos mexilhões do transplante inverso. As razões diagnóstico revelam PAHs petrogénicos e pirolíticos em ambos os ensaios, provenientes respectivamente de petróleo/óleo não queimado e derivados da combustão incompleta de combustíveis e da biomassa.

Durante os ensaios de transplante houve indução da concentração de CYP450 quando os mexilhões são colocados num local mais contaminado, atingindo níveis 1,5 vezes superiores aos iniciais, comprovando a capacidade do CYP450 em ser utilizado como biomarcador de exposição a este tipo de compostos orgânicos. O decréscimo da concentração de CYP450 no transplante inverso (mais contaminado para mais limpo) indica uma regulação do sistema para níveis considerados basais, resultante de uma menor exposição a hidrocarbonetos.

7 – DISCUSSÃO FINAL

O impacto de uma maré negra nos ecossistemas depende em grande medida se decorre em mar aberto ou na zona costeira. As variáveis ambientais (vento, ondulação, correntes, etc) e as características do produto derramado alteram o comportamento da mancha ao longo do tempo, ocorrendo a evaporação quase total dos hidrocarbonetos mais leves nas primeiras horas, tornando a mancha mais espessa, com tendência a emulsificar e sedimentar. Os efeitos de um derrame perduram no tempo, mesmo quando existem sinais de recuperação ambiental dos ecossistemas, na medida em que os hidrocarbonetos são compostos cujas características (baixa solubilidade, elevada lipoficidade, etc) os tornam persistentes. Mesmo existindo em quantidades reduzidas são passíveis de se virem a acumular nos tecidos dos organismos, causando danos imediatos e a longo prazo. Muitos hidrocarbonetos, como os PAHs são reconhecidamente tóxicos, cancerígenos e mutagénicos.

Portugal, devido à sua situação geográfica, apresenta um risco considerável de poluição marítima e costeira, devido à circulação de e para o Mediterrâneo, Norte da Europa, África e América (Fig. 1.5; Cap. 1), tendo-se registado no mar territorial e ZEE cerca de 700 acidentes (dos quais 25% têm origem desconhecida) (Fig. 1.6), e desses 82 ocorreram na costa do Algarve entre 1990 e 2003 (Fig. 1.7; Cap. 1); mais de metade tiveram lugar especificamente em portos devido a operações com navios (CCDRA, 2004; Monteiro e Gouveia, 2005). As fontes crónicas de contaminação também se fazem sentir, devido às actividades portuárias (navegação, estaleiros, abastecimento de postos de combustível, etc), portos de abrigo, resíduos urbanos e industriais, escorrências pluviais e ribeirinhas, deposição atmosférica, e naturais (incêndios florestais).

Nos últimos anos tem havido uma maior atenção na necessidade de detectar e avaliar os efeitos adversos dos poluentes nos organismos expostos a diferentes níveis de

contaminação. O uso integrado de análises químicas de contaminantes e das respostas bioquímicas nos organismos, pode fornecer informação acerca do destino destes compostos a partir do momento em que entram no organismo (biotransformação, acumulação, metabolismo, etc), e tem sido utilizado na avaliação do impacto da poluição no ambiente aquático (Livingstone *et al.*, 1990; Porte *et al.*, 1991; Solé, 2000 a; Porte *et al.*, 2001 a).

O primeiro passo no metabolismo de compostos do petróleo, como os PAHs, é mediado pelo sistema monoxigenase de função mista (MFO), responsável pelas reacções de biotransformação da fase I, no qual o citocromo P450 (CYP450) introduz um átomo de oxigénio aos PAHs, para os tornar mais excretáveis. Pelo facto da concentração do CYP450 e da actividade da sua isoforma CYP1A1 (BPH e EROD) poderem ser induzidas na presença de petróleo/óleo e derivados, quer em laboratório (Livingstone *et al.*, 1985, 1997; Michel *et al.*, 1993, 1994), quer após derrames de petróleo (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 b; Monteiro *et al.*, 2006), quer em estudos de campo (Porte *et al.*, 2001 a,b; Livingstone *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2004; Coimbra *et al.*, 2004), foi proposto usar este sistema de desintoxicação como um biomarcador de exposição a hidrocarbonetos, de modo a avaliar o impacto destes contaminantes nos organismos marinhos (Rattner, *et al.*, 1989; Cajaraville *et al.*, 2005). No entanto, nos estudos de campo, a influência sazonal dos parâmetros abióticos (temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido, etc) assim como dos factores bióticos (reprodução, idade, disponibilidade de alimento), pode tornar a interpretação difícil, sendo a caracterização sazonal destas variáveis uma mais valia na validação do uso destes biomarcadores.

Nesta dissertação foi estudado o impacto dos hidrocarbonetos do petróleo em mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos em oito locais da costa Sul de Portugal com diferentes

graus de contaminação, pelo uso integrado de análises químicas da sua concentração com a resposta bioquímica do sistema MFO. Foi estudada a variação sazonal, espacial e temporal da fracção alifática (Cap. 3) e aromática (Cap. 4) dos hidrocarbonetos e a resposta bioquímica resultante (Cap. 5). No Cap. 6 foi efectuado um transplante cruzado de modo a estabelecer relações de causa-efeito entre a acumulação e depuração dos hidrocarbonetos e a resposta bioquímica.

A variação sazonal e espacial da concentração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos nos tecidos dos mexilhões da costa Sul de Portugal permitiu discriminar locais onde os teores são comparáveis a concentrações detectadas em zonas consideradas limpas, pouco urbanizadas ou de lazer, com níveis basais de hidrocarbonetos (Hermida-Ameijeiras, 1994, 1995; Amodio-Cocchieri e Cirillo, 2003), até zonas consideradas moderadamente ou muito afectadas por hidrocarbonetos, quer devido a contaminações crónicas, como no porto de Leixões (Lima *et al.*, 2007), ou na Lagoa de Veneza (Westzel e Van Vleet, 2004) ou após derrames de petróleo (Solé *et al.*, 1996; Porte *et al.*, 2000 b; Carro *et al.*, 2006) (Tab. 1.3; Cap. 1).

Os níveis de UCM detectados nos tecidos dos mexilhões são cerca de 16 vezes superiores aos de TAlc, tendo ambos um padrão semelhante, enquanto que os níveis de TPAH são uma ordem de grandeza inferior, representando cerca de 1% da concentração total de hidrocarbonetos ($THC = TAlc + UCM + TPAH$). Embora a fracção aromática seja muito menor que a alifática, a concentração de TPAH ao longo da costa é considerado elevado a muito elevado (Baumard *et al.*, 1998d) e é superior nos locais e meses em que a concentração dos HAs é também superior. Ao longo do tempo, os níveis médios de TAlc aumentam em todos os locais, atingindo o máximo no Inverno III (Fig. 3.9), apresentando depois concentrações inferiores no Verão seguinte (Verão de 2004, dia

zero dos ensaios de transplante). Quanto à UCM e aos TPAH, os teores decrescem com o tempo (Fig. 3.9; 4.11) para níveis mínimos de TPAH no Verão de 2004. Considerando que nos petróleos os hidrocarbonetos saturados podem representar mais de 70% dos constituintes e considerando o número de acidentes ocorridos na costa Portuguesa (Fig. 1.6 e 1.7; Cap. 1), os níveis de hidrocarbonetos alifáticos detectados nos tecidos dos mexilhões reflectem contaminações crónicas e persistentes.

Espacialmente, VM e OL (por vezes também LG e PT) são os locais com concentrações mais elevadas de hidrocarbonetos (HAs (Fig. 3.2; 3.5; 3.9) e PAHs (Fig. 4.2; 4.11), associado às actividades dos portos e marinas com tráfego marítimo acentuado, enquanto que FR e TV são os locais com níveis menores de contaminação, podendo ser considerados basais. SG, LG, PT apresentam níveis de hidrocarbonetos por norma moderados. Em VRSA, os teores de HAs no Inverno II (cerca de 8,5 vezes superiores aos valores medianos de TAlc e 12 vezes superior à mediana de UCM), talvez se deva a situações anormais de pluviosidade, com conseqüente aumento do caudal do Rio Guadiana e/ou a algum tipo de derrame ocorrido neste período.

A variação sazonal da concentração de hidrocarbonetos é maior no Outono e Invernos (I, II e III) relativamente à Primavera ao Verão (Fig. 3.1; 3.4; 4.1), e pode estar associado ao aumento dos caudais dos rios, escorrências urbanas e deposição atmosférica. A razão UCM/TAlc revela contaminações mais antigas no Inverno I (UCM/TAlc > 20) até contaminações recentes (Inverno III e Verão de 2004 (dia zero, transplantes)) (UCM/TAlc < 10), em que a degradação ambiental foi menor.

Em geral a distribuição individual dos *n*-alcanos ímpares e pares, nos tecidos dos mexilhões é homogénea, apresentando valores de CPI ≤ 1 , indicando uma origem essencialmente petrogénica da contaminação. Resultados semelhantes foram detectados em mexilhões de Veneza (Wetzel e van Vleet, 2004) e da Galiza (Porte *et al.*, 2000 ab;

Carro *et al.*, 2006). Por outro lado, os *n*-alcanos podem ter origem biogénica, sendo os *n*-alcanos ímpares C15 ao C17 considerados de origem marinha e os *n*-alcanos C27, C29 e C31 considerados de origem terrestre (plantas superiores). Estes *n*-alcanos foram detectados na maioria das amostras, por vezes em concentrações consideráveis, originando $CPI > 1$, mas a sua assinatura é sobreposta pela assinatura petrogénica. Inputs biogénicos para a concentração total de *n*-alcanos foram também detectados noutros estudos (Carro *et al.*, 2006). A origem biogénica ($CPI > 1$) apresenta características marinhas na Primavera e Verão ($C17/C29 > 1$) em SG, FR e OL e características terrestres no Outono e Inverno (I, II e III) ($C17/C29 < 1$) (SG, FR, TV e VRSA), possivelmente relacionadas com fenómenos de *upwelling* e escorrências terrestres, respectivamente.

No que diz respeito à distribuição individual da concentração dos PAHs ao longo da costa e do período estudado, os mexilhões acumulam preferencialmente os compostos de 4 anéis, que podem atingir em média cerca de 66% do total acumulado (Fig. 4.3 e 4.12), sendo o BaA o PAHs principal na maioria das amostras. Estes PAHs, embora presentes em quantidades menores nos petróleos, têm também origem na combustão incompleta dos combustíveis fósseis ou da combustão de biomassa, que conjuntamente com os PAHs de elevado peso molecular de 5 e 6 anéis, conferem um perfil pirolítico aos PAHs acumulados. Os PAHs de baixo peso molecular (2 e 3 anéis) estão também presentes, sendo o acenafteno o principal. Os compostos de 2 e 3 anéis são geralmente considerados petrogénicos, e estão presentes nos petróleos/óleos em maior proporção que os restantes. Por serem mais solúveis estão mais biodisponíveis para acumulação, mas também por se evaporarem mais rapidamente podem não estar presentes, o que foi reflectido na proporção destes compostos nos tecidos dos mexilhões (em média cerca de 17% do total de PAHs). Por outro lado, os PAHs mais solúveis são mais facilmente

eliminados pelos moluscos bivalves que os de elevado peso molecular, dado que os primeiros podem ser eliminados através de eliminação passiva enquanto que os segundos necessitam de metabolização prévia de modo a serem eliminados dos tecidos (Neff, 2002). No Inverno III a proporção de PAHs de 2+3 anéis aumentou em todos os locais, excepto em FR, onde os PAHs de 5+6 anéis são predominantes.

As razões de diagnóstico entre pares de isómeros de PAHs indicam a existência de fontes petrogénicas e pirolíticas de PAHs, em toda a costa e ao longo do tempo (Fig. 4.8; 4.9; 4.14 e 4.15). VM e OL apresentam características maioritariamente pirolíticas e FR e TV maioritariamente petrogénicas. A análise comparativa com assinaturas tipo (Fig. 4.10 e 4.16) revelou que as fontes de PAHs para o meio marinho podem ser derivadas das actividades domésticas, do tráfego marítimo e actividades portuárias, queima de biomassa proveniente dos incêndios e da utilização de carvão e lenha, e de produtos de petróleo não queimado, proveniente de derrames nas zonas portuárias. As correntes oceânicas e o elevado tráfego marinho e costeiro (Fig. 1.5) podem também contribuir para as elevadas concentrações de PAHs detectadas nos organismos.

Tendo-se analisado a variação sazonal e espacial da concentração total e individual dos hidrocarbonetos, no Capítulo 5 foram avaliadas as respostas do sistema MFO, de modo a estabelecer uma relação entre os contaminantes e a capacidade metabólica dos mexilhões.

A concentração e actividades dos componentes do sistema MFO são da mesma ordem de grandeza dos detectados noutros locais, quer sejam zonas onde a contaminação é considerada basal ou baixa, como em locais onde a concentração de hidrocarbonetos é elevada (Tab. 1.5; Cap.1). Os componentes do sistema MFO mostram uma dependência entre si, relacionando-se o CYP450 com o P418 ($r = 0,76$ e $0,85$), a NADPH-red ($r = 0,73$ e $0,79$), o citocromo b_5 ($r = 0,68$ e $0,69$) e a NADH-red ($r = 0,49$ e $0,76$),

respectivamente no período anual e temporal. O citocromo b₅ e a NADH-red também se relacionam entre si ($r = 0,69$ e $0,81$). A NADH-red e o citocromo b₅ parecem assim participar na actividade catalítica do CYP450, em que a NADH-red é usada na transferência de electrões para o CYP450, quer por intermédio do citocromo b₅ como por uma via independente da NADPH-red.

A variação espacial, sazonal e temporal da concentração e actividade dos componentes do sistema MFO segue um padrão semelhante à dos hidrocarbonetos alifáticos (Cap. 3) e aromáticos (Cap. 4), com teores elevados nos locais onde a presença de contaminantes também é mais elevada (VM e OL), e mais elevada nos meses de Outono e Inverno. Este padrão sazonal está de acordo com outros trabalhos, onde se verificou um decréscimo da concentração de CYP450 na Primavera e no Verão, associado ao aumento da temperatura e ao ciclo reprodutor (pós-desova), simultâneo com o decréscimo dos teores gerais de hidrocarbonetos (Kirchin *et al.*, 1992; Solé *et al.*, 1995; Winstein, 1995).

O CYP450 e as suas actividades específicas, como a benzo(a)pireno hidroxilase e o EROD, têm sido largamente utilizadas como biomarcadores de exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros compostos orgânicos como os PCBs, existindo uma relação significativa entre a concentração de CYP450 e a concentração dos compostos orgânicos. A indução do CYP450 e da sua isoforma CYP1A1 na presença de PAHs foi confirmada tanto em trabalhos de campo (reflectindo padrões espaciais de contaminação), quer em trabalhos de exposição a compostos orgânicos em laboratório (Livingstone *et al.*, 1995, 1998; Peters *et al.*, 1999; Coimbra *et al.*, 2004; Lopes e Bebianno, 2008). Nesta dissertação o CYP450 e o citocromo b₅ correlacionam-se com a concentração de hidrocarbonetos alifáticos (TAIc e UCM) e aromáticos (PAHs), enquanto que a NADPH-red apenas tem uma relação significativa com os

alifáticos e a NADPH-red não se relaciona com nenhuma das fracções dos hidrocarbonetos (Tab. 5.3; Fig. 5.15). O CYP450 e as restantes componentes do sistema MFO estão mais relacionadas com os *n*-alcanos e os PAHs de maior peso molecular (Fig. 5.16). Verifica-se assim uma resposta do CYP450 ao gradiente de contaminação crónica, associada a actividades de marinas e portos, sendo a primeira vez que se relaciona a indução do sistema MFO em moluscos, com a acumulação de *n*-alcanos.

Embora haja uma relação positiva entre o CYP450 e os PAHs ao longo do tempo e espacialmente, a concentração de CYP450 aumenta gradualmente do Inverno I para o III, enquanto que a concentração de TPAH é superior no Inverno I relativamente ao III, particularmente em VM. Assim, as concentrações consideradas muito elevadas em VM no Inverno I poderão ter saturado a capacidade metabólica do sistema MFO, provocando maiores taxas de acumulação do que de metabolização, vindo a capacidade metabólica a aumentar nos meses seguintes, respondendo o CYP450 mais rapidamente a concentrações menores de PAHs (Fig. 5.15B) (Lopes e Bebianno, 2008). Por outro lado, as diferenças nas concentrações de PAHs acumulados poderão estar relacionadas com menores *inputs* de contaminantes ao longo do tempo, ou com o metabolismo gradual dos mesmos, que reduz os teores acumulados nos tecidos.

Uma vez demonstrada a existência de uma relação entre os teores de CYP450 e os níveis de TPAH, uma experiência de biomonitorização activa foi planeada (Cap. 6), de modo a clarificar o mecanismo de acumulação dos diferentes hidrocarbonetos (HAs e PAHs), o seu metabolismo e os seus efeitos no sistema MFO. Quando transplantados de um local mais limpo (TV) para um local contaminado (VM), os mexilhões acumulam hidrocarbonetos alifáticos e UCM que podem atingir, respectivamente, concentrações 6 a 4 vezes superiores à concentração de base, diminuindo depois em 40 e 60% quando são colocados no local de origem. Por outro lado, os mexilhões eliminam os teores de

hidrocarbonetos acumulados nos tecidos quando transferidos de um local contaminado (VM) para um local limpo (TV), podendo o decréscimo atingir cerca de 50% da concentração de base. A acumulação é assim mais rápida que a depuração (Fig. 6.1).

O perfil individual da distribuição de *n*-alcanos é também diferente consoante o ensaio, havendo um incremento de *n*-alcanos pares e biogénicos marinhos nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura ($C17/C29 >1$) (Fig. 6.2) e um incremento de *n*-alcanos terrestres no transplante inverso ($C17/C29 <1$) (Fig. 6.3). A razão UCM/TAlc em ambos os ensaios revela contaminações recentes, de origem petrolífera ($CPI \approx 1$) com degradação ambiental reduzida dos *n*-alcanos lineares relativamente aos ramificados ($C17/Pris$ e $C18/Fit \leq 1$) indicando a presença de crónica de óleos/petróleos (Tab. 6.1 e 6.2). Simultaneamente, os níveis de TPAH aumentam cerca de 4 vezes nos mexilhões de Tavira transplantados para Vilamoura, e quando voltam para o local de origem, diminuem apenas 27%. No ensaio inverso os teores de TPAH são 2,5 vezes menores que no início, atingindo a concentração inicial um mês após voltarem ao local de origem, revelando uma maior contaminação ambiental em VM (Fig. 6.5). A acumulação de PAHs é também mais rápida que a sua depuração, tal como ocorrido na fracção alifática. Quanto ao perfil da distribuição individual dos PAHs, este altera-se, aumentando os PAHs pirolíticos de 4, 5 e 6 anéis nos mexilhões transplantados de Tavira para Vilamoura, e os petrogénicos de 2 e 3 anéis nos mexilhões do transplante inverso (Fig. 6.6). Os PAHs predominantes nos dois ensaios são o BaA, o Cris, com contributos importantes de Acftn (Fig. 6.7 e 6.8). As razões diagnóstico revelam PAHs petrogénicos e pirolíticos em ambos os ensaios, provenientes respectivamente de petróleo/óleo não queimado e derivados da combustão incompleta de combustíveis e da biomassa (Fig. 6.10 e 6.11). De um modo geral, a taxa de acumulação dos hidrocarbonetos é superior à taxa de depuração, adquirindo os mexilhões características

dos locais para onde foram transplantados. Resultados idênticos foram observados em ensaio de transplante de zonas limpas (mar Adriático) para zonas mais contaminadas (canais de Veneza) e vice-versa (Wetzel e Van Vleet 2004).

A variação da concentração do CYP450 e restantes componentes do sistema MFO durante os ensaios de transplante, indica que houve indução da concentração de CYP450 quando os mexilhões são colocados num local mais contaminado, atingindo níveis 1,5 vezes superiores aos iniciais, comprovando a capacidade do CYP450 em ser utilizado como biomarcador de exposição a este tipo de compostos orgânicos. O decréscimo da concentração de CYP450 no transplante inverso (mais contaminado para mais limpo) indica uma regulação do sistema para níveis considerados basais, o que também está de acordo com a utilização do CYP450 como biomarcador de exposição. A indução de CYP450 foi também observada em mexilhões *M. edulis* transplantados de uma zona limpa para uma zona afectada cronicamente com PAHs e PCBs (Shaw *et al.*, 2002), ocorrendo um aumento de cerca de 1,4 vezes na proteína CYP1A, relativamente ao controlo. Do mesmo modo, Förlin *et al.* (1996) verificaram um aumento de 2 a 3 vezes da actividade da enzima BPH (mediada pelo CYP450) em simultâneo com o aumento da concentração de TPAH (2,5 vezes) em mexilhões transplantados das ilhas Faroe (local limpo) para Skagerrak (Mar do Norte). Tal como verificado anteriormente (Cap. 5), os teores de CYP450 estão directamente relacionados com a concentração dos PAHs (Fig. 6.14) e parecem estar mais relacionados com os *n*-alcanos e PAHs de elevado peso molecular (Fig. 6.15). A variação da concentração e da actividade dos restantes componentes do sistema MFO acompanha a do CYP450, embora menos pronunciadamente durante cada transplante e entre transplantes.

7.1 - CONCLUSÕES

1. A concentração dos hidrocarbonetos de petróleo (Has e PAHs) nos mexilhões da costa Sul de Portugal é considerada elevada a muito elevada (TAlc $>20 \mu\text{g/g ph}$; TPAH $>1000 \text{ ng/g ph}$), havendo no entanto locais onde esses teores são menores, permitindo discriminar zonas onde a contaminação apresenta valores considerados de base (TAlc $1-7 \mu\text{g/g ph}$; TPAH $20-200 \text{ ng/g ph}$), para a área em estudo.
2. A variação espacial indica que VM e OL são os locais mais problemáticos, enquanto que FR e TV apresentam os menores níveis de contaminação por estes compostos.
3. A variação sazonal revela concentrações superiores no Outono e Inverno, relativamente à Primavera e ao Verão. O primeiro caso pode estar relacionado o aumento das escorrências pluviais, aumento dos caudais dos rios e deposição atmosférica. No segundo caso a desova nos meses da Primavera e Verão poderão contribuir para o efeito de depuração. As gónadas são tecidos ricos em lípidos e os PAHs são compostos lipofílicos, podendo pois acumular-se neste tecido. Quando se dá a expulsão das células sexuais, os PAHs associados poderão por conseguinte ser “expulsos” também. No entanto, nesta dissertação os teores de PAHs não se relacionem com os teores em lípidos, embora apresentem uma tendência crescente.
4. Os *n*-alcanos, isoprenoides e PAHs individuais indicam contaminações petrogénicas e pirolíticas, com origem em petróleo/óleo não queimado, combustão incompleta de combustíveis fósseis e combustão de biomassa. As fontes mais prováveis destes hidrocarbonetos são os derrames acidentais ou intencionais de produtos petrolíferos junto às zonas portuárias ou ao largo da

- costa (que são trazidos para a zona costeira pela acção das correntes ou marés), tráfego marítimo comercial e de lazer, escorrências urbanas e ribeirinhas associadas a períodos de chuva, fogos florestais e actividades domésticas.
5. A tendência geral da contaminação ao longo do tempo é de decréscimo, indicando uma redução nos *inputs* antropogénicos e uma melhoria geral das condições ambientais.
 6. As concentrações e actividades dos componentes do sistema MFO nos mexilhões da costa Sul estão de acordo com os referidos na bibliografia, para locais não contaminados e contaminados com hidrocarbonetos.
 7. A variação sazonal e espacial da concentração de CYP450 apresenta o mesmo padrão que o dos hidrocarbonetos, existindo uma relação significativa entre si.
 8. Nos ensaios de transplante os organismos acumulam hidrocarbonetos de modo diferente, adquirindo os mexilhões características do local para onde foram transplantados. A acumulação de hidrocarbonetos está directamente relacionada com a concentração de CYP450, enfatizando o metabolismo deste tipo de compostos pelo mexilhão *M. galloprovincialis*. Simultaneamente, no transplante inverso, a diminuição dos teores de hidrocarbonetos levou a um decréscimo dos níveis de CYP450.
 9. A acumulação dos compostos do petróleo nesta espécie e nestes locais é mais rápida que a sua depuração.

No final desta dissertação, algumas perspectivas futuras foram consideradas:

Foi provada a existência de hidrocarbonetos do petróleo nos mexilhões da costa Sul de Portugal. No entanto alguns marcadores petrogénicos não foram identificados, como os

hopanos e esteranos, assim como toda a gama de PAHs alquilados. Sendo estes úteis na identificação do tipo de contaminação e na atribuição de assinaturas tipo, a sua quantificação deverá ser implementada no futuro.

Por outro lado, foi verificada a indução de CYP450 na presença de hidrocarbonetos. As actividades específicas da isoforma CYP1A1 como a BPH, e a EROD podem ser também uma mais valia na avaliação dos efeitos da exposição. As enzimas da fase II da biotransformação (como a GST) têm como função “sequestrar” os metabolitos resultantes das reacções da fase I (CYP450) e transportá-los para fora das células. A sua determinação permitirá um estudo mais globalizado do metabolismo dos hidrocarbonetos.

Dado que os bivalves (amêijoas, mexilhões, ostras) fazem parte da alimentação humana, sendo o seu consumo frequente na população Algarvia, seria de todo o interesse avaliar os possíveis efeitos desse consumo nos níveis de hidrocarbonetos ingeridos e transformação dos mesmos pelo citocromo P450. Por exemplo, nos humanos o CYP450 e as suas isoformas foram detectadas em concentrações elevadas nos pulmões de fumadores, relacionado com os PAHs libertados no tabaco. O CYP450 está também relacionado com o metabolismo de medicamentos como a aspirina (entre muitos outros).

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes, R; Assunção, J.V.; Pesquero, C.R., 2004. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from light-duty diesel vehicles exhaust. *Atmospheric Environment* 38: 1631–1640

Alvarez-Legorreta, T.; Gold-Bouchot, G.; Zapata-Perez, O., 1994. Hydrocarbon concentrations in sediments and clams (*Rangia cuneata*) in Laguna de Pom México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54: 39–45.

Amodio-Cocchieri, R.; Cirillo, T., 2003. Aliphatic hydrocarbons in biota from the Gulf of Naples (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 46: 362–377

Axelman, J.; Naes, K.; Näf, C.; Broman, D., 1999. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and caged mussels (*Mytilus edulis*) in relation to water column phase distribution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2454-2461.

Azdi, M.; Moukrim, A.; Burgeot, T.; Budzinski, H.; Chiffolleau, J.F.; Kaaya, A.; Zekhnini, A.; Narbonne, J.F.; Guarrigues, P., 2006. Hydrocarbon pollution along Moroccan coasts and BPH activity in the mussel *Perna perna*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 26: 265–282,

Barreira, L.A., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stress in the clam *Ruditapes decussatus* from the Ria Formosa (Portugal). Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, 265 p.

Barreira, L.A.; Mudge, S.M.; Bebianno, M.J., 2007 a. Oxidative stress in the clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon body burden. *Environmental Toxicology*, 203-221.

Barreira, L.A.; Mudge, S.M.; Bebianno, M.J., 2007 b. Polycyclic aromatic hydrocarbons in clams *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Environmental Monitoring*, 9:187-198

Barreira, L.A.; Mudge, S.M.; Bebianno, M.J., 2007 c. Concentration and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Ria Formosa Lagoon. *Environmental Forensics*, 8: 231-243.

- Barroso, C.M.; Mendo, S.; Moreira, M.H., 2004. Organotin contamination in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from portuguese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 1145–1167
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P., 1998 a. PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 36(8): 577-586.
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P., 1998 d. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(5): 765-776.
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Dizer, H.; Hansen, P.D., 1999 a. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, 47: 17–47.
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Narbonne, J.F.; Burgeot, T.; Michel, X.; Bellocq, J., 1999 b. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination and bioavailability. *Marine Environmental Research*, 47: 415-439.
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Sorbe, J.C.; T. Burgeot, T.; Bellocq, J., 1998 b. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, 36(12): 951-960.
- Baumard, P.; Budzinski, H.; Michon, Q.; Garrigues, P.; Burgeot, T.; Bellocq, J., 1998 c. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47: 77–90
- Bayne, L., 1989. The biological effects of marine pollutants. In: Albaigés, J. (Ed), *Marine pollution*. Hemisphere Publishing Corporation, 131-152.
- Bebianno, M.J. e Machado, L.M., 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Coast of Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, 34(8): 666-671.

Bebianno, M.J.; Lopes, B.; Guerra, L.; Hoarau, P.; Ferreira, A.M., 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environment International* 33 (4), 550–558.

Bernard, D.; Jeremy, J.J.; Pascaline, H., 1995. First assessment of hydrocarbon pollution in a mangrove estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (2): 146-150

Bodin, N.; Burgeot, T.; Stanisière, J.Y.; Bocquené, G.; Menard, D.; Minier, C.; Boutet, I.; Amat, A.; Cherel, Y.; Budzinski, H., 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138: 411–427

Boehm, P.D.; Mankiewicz, P.J.; Hartung, R.; Neff, J.M.; Page, D.S.; Gilfillan, E.S.; O'Reilly, J.E.; Parher, K.R., 1996. Characterization of mussel beds with residual oil and the risk to foraging wildlife 4 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (8):1289-1303

Boulabassi, I.; Lipiatou, E.; Salliot, A.; Tolosa, I.; Bayona, J.M.; Albaigés, J., 1997. Carbon sources and cycle in the western Mediterranean-the use of molecular markers to determine the origin of organic matter *Deep-Sea Research II*, 44, (34): 781-799.

Bouloubassi, I.; Saliot, A., 1993. Dissolved, particulate and sedimentary naturally derived polycyclic aromatic hydrocarbons in a coastal environment: geochemical significance. *Marine Chemistry*, 42: 127-143.

Broman, D.; Näf, C.; Lundbergh, I.; Zebühr, Y., 1990. An in situ study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aquatic food chain (seston - *Mytilus edulis*) L.-Somateria from the Baltic: an ecotoxicological perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 429-442.

Bucheli, e Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25: 201– 268.

Budzinski, H.; Jones, I.; Bellocq, J.; Pierard, C.; Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry*, 58: 85–97.

Buhler, D.R.; Williams, D.E., 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: oxidative enzymes (or phase I enzymes). *In*: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press. 151-184

Burgeot, T.; Bocquéné, G.; Porte, C.; Dimeet, J.; Santella, R.M.; Garcia de la Parra, L.M.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Raoux, C.; Galgani, F., 1996. BioIndicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 131: 125-141.

Burns, K.A.; Smith, J., 1981. Biological monitoring of ambient water quality: the case for using bivalves as sentinel organisms for monitoring petroleum pollution in coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 13: 433-443.

Burns, W.A.; Mankiewicz, P.J.; Bence, A.E.; Page, D.S.; Parker, K.R., 1997. A principal-component and least-squares method for allocating polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment to multiple sources. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (6): 1119-1131.

Burt, J.S.; Ebell, G.F., 1995. Organic pollutants in mussels and sediments of the coastal waters of Perth, Western Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (11): 723-732

Cáceres-Martínez, J.; Figueras, A., 1998. Long-term survey on wild and cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk reproductive cycles in the Ria de Vigo NW Spain *Aquaculture*, 162: 141–156

Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 247: 295–311.

Cancio, I.; Ibabe, A.; Cajaraville, M.P., 1999. Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its

relationship with the lipid content. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 123:135–144.

Carro, N.; Cobas, J.; Maneiro, J., 2006. Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: Spatial and temporal trends, *Environmental Research*, 100: 339–348

CCDRA, 2004. Sistema de indicadores de desenvolvimento sustentável do Algarve – componente Ambiental. ISBN 972-95734-5-X.

CCDRA, 2005. Relatório de estado do ambiente (Algarve) 2003. ISBN 972-95734-7-6.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 52: 189-203.

Clark, R.B., 2001. Marine pollution. 5th Edition. Oxford Science Publications. Oxford University Press. 237 p.

Clark, R.C.; Blumer, M., 1967. Distribution of *n*-paraffins in marine organisms and sediment. *Limnology and Oceanography*, 12: 19-87.

CNADS (Conselho Nacional do Ambiente e do Desenvolvimento Sustentável), 2001. Reflexão do CNADS sobre o desenvolvimento sustentável da zona costeira. CNADS, 53 p.

Coelho, M.R.; Bebianno, M.J.; Lansgton, W.J., 2002. Organotin levels in the Ria Formosa lagoon, Portugal. *Applied Organometallic Chemistry*, 16:384–390.

Coimbra, J.; Guilhermino, L.; Santos, P.; Sousa-Pinto, I.; Santos, M.; Pereira, R.; Lima, I., 2004. Relatório do grupo de trabalho sobre o derrame do Prestige. CIMAR, 110 p.

Colombo, J.C.; Barreda, A.; Bilos, C.; Cappelletti, N.; Demichelis, S.; Lombardi, P.; Migoya, M.C.; Skorupka, C.; Suárez, G., 2005. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. *Environmental Pollution*, 134: 277–289.

Company, R.; Serafim A.; Lopes B.; Cravo, A.; Shepherd, T.J.; Pearson, G., Bebianno, M.J., 2008. Using biochemical and isotope geochemistry to understand the environmental and public health implications of lead pollution in the lower Guadiana River, Iberia: A freshwater bivalve study. *Science of the Total Environment*, 405: 109-119.

Corsi, I.; Mariottini, M.; Sensini, C.; Lancini, L.; Focardi, S., 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 203–212

Cripps, G.C.; Prindle, J., 1995. Hydrocarbon content of an Antarctic infaunal bivalve - historical record or life cycle changes? *Antarctic Science*, 7 (2): 127-136

Culbertson, J.B.; Valiela, I.; Olsen, Y.S.; Reddy, C.M., 2008. Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Environmental Pollution*, 154: 312-319

Da Ros, L., Meneghetti, F. and Nasci, C., 2002. Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). *Marine Environmental Research*, 54: 817-822.

Damásio, J.B.; Barata, C.; Munné, A.; Ginebreda, A.; Guasch, H.; Sabater, S.; Caixach, J.; Porte, C., 2007. Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, 66: 1206–1216.

Damiens, G.; Gnassia-Barelli, M.; Loquès, F.; Roméo, G.; Salbert, V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66: 574–583.

Danovaro, R.; Fabiano, M.; Albertelli, G., 1995. Possible use of RNA/DNA ratio for detecting oil induced disturbance: a field report. *Chemistry and Ecology*, 11: 1-10.

David, A; Dagnino, S.; Pichot, Y.; Munaron, D.; Escande, A.; Casellas, C.; Fenet, H.; Gomez, E., 2008. Temporal study of estrogenic responses of mussel (*Mytilus*

galloprovincialis) extracts applied to reporter cell lines. *Marine Environmental Research*, 66: 105–107

DeLeon, I.R.; Ferrario, J.B.; Byrne, C.J., 1988. Bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam, *Rangia cuneata*, in the vicinity of a creosote spill. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 872-879.

den Besten, P.J., 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 121: 139–146.

den Besten, P.J.; Herwig, H.J.; Donselaar, E.G.; Livingstone, D.R., 1990. Cytochrome P-450 monooxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in echinoderms. *Marine Biology*, 107: 171-177.

DGA (Direcção Geral do Ambiente), 2000. Relatório de estado do ambiente, 1999. ISBN 972-8419-49-X

DGPA (Direcção Geral das Pescas e Aquicultura), 2004. Recursos da pesca. Série estatística. Vol 17 A-B, Ano 2003. 169 p

Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M. & Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. *In*: Rand, G.M. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. 2nd Ed. Taylor & Francis, Washington, 523-561.

Dickhut, R.M. and Gustafson, K.E., 1995. Atmospheric inputs of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls to southern Chesapeake Bay. *Marine Pollution Bulletin*, 30(6): 385-396.

Dickhut, R.M.; Canuel, K.E.; Gustafson, K.E.; Liu, K.; Arzayus, K.M.; Walker, S.E.; Edgecomb, G.; Gaylor, O.; MacDonald, E.H., 2000. Automotive sources of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matter in the Chesapeake Bay region. *Environmental Science and Technology*, 34: 4635-4640.

Díez, S., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. and Bayona, J. M., 2005. Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999/2000. *Environmental Pollution*, 136: 525-536.

DiSalvo, L.H., Guard, H.E., Hunter, L., 1985. Tissue hydrocarbon burden of mussels as a potential monitor of environmental hydrocarbon insult. *Environmental Science and Technology*, 9: 247-251.

Ertl, R.P.; Winston, G.W., 1998. The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121C: 85–105

Estabrook, R.W.; Werringloer, 1978. The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *In: Fleisher, S. & Packer, L. (Ed.) Methods of enzymology, Vol. LII. Biomembranes: Part C: biological oxidations, microsomal, cytochromes and other hemoprotein systems. Academic Press, New York, 212-220.*

Fabbri, D.; Baravelli, V.; Giannotti, K.; Donnini, F.; Fabbri, E., 2006. Bioaccumulation of cyclopenta[cd]pyrene and benzo[ghi]fluoranthene by mussels transplanted in a coastal lagoon. *Chemosphere*, 64: 1083–1092

Farrington, J.W., 1989. Bioaccumulation of hydrophobic organic pollutant compounds. *In: Levin, S.A.; Harwell, M.A.; Kelly, J.R.; Kimball, K.D. (Ed.) Ecotoxicology: problems and approaches. Springer-Verlag, New York Inc., 279-313.*

Farrington, J.W.; Meyers, P.A., 1975. Hydrocarbons in the marine environment. *In: Eglinton G., (Ed.), Environmental chemistry. The Chemical Society, London. 109-136.*

Fernandes, D.; Andreu-Sánchez, O.; Bebianno, M.J.; Porte, C., 2008. Assessment of pollution along the Northern Iberian shelf by the combined use of chemical and biochemical markers in two representative fish species. *Environmental Pollution*, 155: 327-335.

Fernandes, R., 2001. Modelação de derrames de hidrocarbonetos. Tese de Licenciatura em Engenharia do Ambiente, Instituto Superior Técnico, 67p.

Ferreira, A.M.; Micaelo, C.; Vale, C., 2003. Are coastal resources of NW Portugal fingerprinting hydrocarbons released from the *Prestige* accident? *Ciências Marinas*, 29 (1): 109–114

Ferreira, A.M.; Vale, C., 1995. The importance of runoff to DDT and PCB inputs to the Sado Estuary and Ria Formosa. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 29(3-4): 211-216.

Ferreira, A.M.; Vale, C., 1998. PCB accumulation and alterations of lipids in two length classes of the oyster *Crassostrea angulata* and of the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*, 45(3): 259-268.

Fingas, M.; Jokuty P.; Fieldhouse, B., 1996. Oil spill behaviour and modeling. Environmental Technology Center, Environment Canada, Ottawa, Canada

Förlin, L.; Livingstone, D.R.; Magnusson, K.; Peters, L.D.; Solé, M.; Sjölin, A.; Granmo, A., 1996. Molecular investigations into pollutant impact on roundnose grenadier (*C. rupestris*) and transplanted common mussel (*M. edulis*) in Skagerrak, the North Sea *Marine Environmental Research*, 42 (1-4): 209-212, 1996

Francioni, E.; Wagener, A.; Scofield, A.L.; Depledge, M.H.; Cavalier, B., 2007. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 329–338.

Fu, G.; Kan, A.T.; Thomson, M., 1994. Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (10): 1559-1567.

Gagné, F.; Blaise, C.; Pellerin, J.; Gauthier-Cler, S., 2002. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Marine Environmental Research*, 53: 295–310

Garmendia, L., 2008. Monitoring of the Prestige oil spill biological effects based on the biomarker approach: mussel watch from Galicia to Basque coast. Ph. D. Thesis. Universidad del Pais Basco, 374 p.

GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution), 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. *Reports and Studies*, GESAMP, 50: 180 p.

- Gilewicz, M.; Guillaume, J.R.; Carles, D.; Leveau, M.; Bertrand, J.C., 1984. Effects of petroleum hydrocarbons on the cytochrome P₄₅₀ content of the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 80: 155-159.
- Goksøyr, A., 1995. Use of cytochrome P4501A (CYP1A) in fishes as a biomarker of aquatic pollution. *Archives of Toxicology*, (Suppl), 17: 80-95.
- Goksøyr, A.; Förlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22: 287-311.
- Goksøyr, A.; Anderson, T.; Buhler, D.R.; Stegeman, J.J.; Williams, D.E.; Förlin, L., 1991. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiology and Biochemistry*, 9: 1-13.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch - a first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6: 111
- Goldberg, E.D., 1976. The health of the oceans. The UNESCO Press, Paris, 172 p.
- Gold-Bouchot, G.; Simá-Alvarez, R.; Zapata-Pérez, O., Güemez-Ricalde, J., 1995. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12): 439-445.
- Granby, K.; Spliid, N.H., 1995. Hydrocarbons and organochlorines in common mussel from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (1): 74-82.
- Gschwend, P.M.; Hites, R.A., 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the north eastern United States. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45 (12): 2359-2367.
- Guengerich, P.F., 2005. Reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440: 204-211

- Guinan, J.; Charlesworth M.; Service, M.; Oliver, T., 2001. Sources and geochemical constraints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments and mussels of the Northern Irish Sea-loughs. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 1073-1081
- Guzzella, L.; Paolis, A.D., 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 28 (3): 159-165.
- Hahn, M.E.; Stegeman, J.J., 1994. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127 (2): 187-198
- Henry, J.A., 1998. Composition and toxicity of petroleum products and their additives. *Human and Experimental Toxicology*, 17 (2): 111-123.
- Hermida-Ameijeiras, A.; Simal-Gándara, J.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J., 1994 a. Aliphatic hydrocarbon levels in farmed and free-living mussels from Galicia (N.W. Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 28: 178-181.
- Hermida-Ameijeiras, A.; Simal-Gándara, J.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J., 1994 b. Classification of the coastal waters of Galicia (NW Spain) on the basis of total aliphatic hydrocarbon concentrations in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Marine Pollution Bulletin*, 28 (6): 396–398.
- Hermida-Ameijeiras, A.; Simal-Gándara, J.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J., 1995. Evaluation of the performance of a multiresidue gas chromatographic method for the determination of aliphatic hydrocarbons in mussels of Galicia (N.W. Spain). *Water Research*, 29: 2118–2124.
- James, M.O.; Kleinow, K.M., 1994. Trophic transfer of chemicals in the aquatic environment. *In*: Malins, D.C. & Ostrander, G.K. (Ed.), *Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publishers. 1-35
- Jeng, W-L., 2006. Higher plant *n*-alkane average chain length as an indicator of petrogenic hydrocarbon contamination in marine sediments. *Marine Chemistry*, 102: 242–251

- Josephy, P.D., 1997. Molecular toxicology. Oxford University Press, 368 p.
- Kennish, M.J., 1992. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. Marine Science Series. CRC Press., 494 p.
- Kerr, J.M., H.R. Melton, S.J. McMillen, R.I. Magaw, and G. Naughton. 1999. Polyaromatic hydrocarbon content in crude oils around the world. SPE 52724. Paper presented at the 1999 SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference, Austin, TX. Society of Petroleum Engineers, Richardson, TX. 10 pp.
- Kirchin, M.A.; Wiseman, A.W.; Livingstone, D.R., 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemical Physiology*, 101C (1): 81-91
- Laffon, B.; Rábade, T.; Pásaro, E.; Méndez, J., 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International*, 32: 342 – 348
- Lavado, R.; Urenã, R.; Martin-Skilton, R.; Torreblanca, A.; Ramo, J.; Raldúa, D.; Porte, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*, 139: 330-339.
- Law, R.J.; Biscaya, J.L., 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Marine Pollution Bulletin*, 29 (4-5): 235-341.
- Law, R.J.; Kelley, C.A.; Graham, K.L.; Woodhead, R.J.; Dyrinda, P.E.J.; Dyrinda, E.A., 1997. Hydrocarbons and PAH in fish and shellfish from southwest Wales following the *Sea Empress* oil spill in 1996. In: Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, 205–211.
- Laws, E.A., 1993. Aquatic pollution. An introductory text. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc. 611p.
- Lee, R.F.; Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 705–723

Libes, S.M., 1991. An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley & Sons, Inc., 734 p.

Lima, D.; Santos, M.M.; Ferreira, A.M.; Micaelo, C.; Reis-Henriques, M.A., 2008. The use of the shanny *Lipophrys pholis* for pollution monitoring: A new sentinel species for the northwestern European marine ecosystems. *Environment International*, 34: 94-101

Lima, I.; Moreira, S.M.; Rendón-Von Osten, J.; Soares, A.M.; Guilhermino, L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, 66: 1230–1242

Lindsay, S., 1992. High Performance Liquid Chromatography, (2 nd). John Wiley & Sons. London.

Lipiatou, E.; Albaigés, J., 1994. Atmospheric deposition of hydrophobic organic chemicals in the northwestern Mediterranean Sea: comparison with the Rhone River input. *Marine Chemistry*, 46, 153-164.

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.

Lipiatou, E.; Tolosa, I.; Simó, R.; Bouloubassi, I.; Dachs, J.; Marti, S.; Sicre, M-A.; Bayona, J.M.; Grimalt, J.O.; Saliot, A.; Albaigés, J., 1997. Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research*, 44: 881-905.

Livingstone, D.R., 1987. Seasonal responses to diesel oil and subsequent recovery of the cytochrome P-450 monooxygenase system in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. *The Science of the Total Environment*, 65: 3-20.

Livingstone, D.R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Marine Ecology. Progress Series*, 46: 37-43.

Livingstone, D.R., 1990. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochemical Society Transactions*, 18: 15-19.

Livingstone, D.R., 1991 a. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative Environmental Physiology*, 7: 45-185.

Livingstone, D.R., 1991 b. Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 100(1-2):151-155.

Livingstone, D.R., 1992. Persistent pollutants in marine invertebrates. *In*: Walker, C.H.; Livingstone, D.R. (Ed.), Persistent pollutants in marine ecosystems., SETAC Special Publication Series, Pergamon Press. 3-34.

Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57: 195-211.

Livingstone, D.R., 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1(3): 88-94.

Livingstone, D.R., 1996. Cytochrome P450 in pollution monitoring. Use of cytochrome P4501A (CYP1A) as a biomarker of organic pollution in aquatic and other organisms. *In*: Environmental Xenobiotics. Richardson, M. (Ed.), London: Taylor & Francis, 143-160.

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 120: 43-49

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 656-666.

Livingstone, D.R.; Archibald, S.; Chipman, J.K.; Marsh, J.W., 1992 a. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 91: 97-104

Livingstone, D.R.; Arnold, R.; Chipman, K.; Kirchin, M.A.; Marsh, J., 1990. The mixed-function oxygenase system in molluscs: metabolism, responses to xenobiotics and toxicity. *Océanis*, 16(5): 331-347.

Livingstone, D.R.; Donkin, P.; Walker, C.H., 1992 b. Pollutants in marine ecosystems: an overview. *In*: Walker, C.H. & Livingstone, D.R. (Ed.), Persistent pollutants in marine ecosystems., SETAC Special Publication Series, Pergamon Press. 235-263.

Livingstone, D.R.; Farrar, S.V., 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo(a)pyrene metabolism in the common mussel, *Mytilus edulis*. *The Science of the Total Environment*, 39: 209-235.

Livingstone, D.R.; Farrar, S.V., 1985. Responses of the mixed-function oxidase system of some bivalve and gastropod molluscs to exposure to polynuclear aromatic and other hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 17: 101-105.

Livingstone, D.R.; Förlin, L.; George, S.G., 1994. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. *In*: Sutcliffe, D.W. (Ed.), Water quality and stress indicators in marine and freshwater systems: linking level of organisation. Freshwater Biological Association., 154-171.

Livingstone, D.R.; Goldfarb, P.S., 1998. Aquatic environmental biomonitoring: use of cytochrome P450 1A and other molecular biomarkers in fish and mussels. *In*: Lynch, J., Wiseman, A. (Eds.), Biotechnology Research Series Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface, Vol. 6. Cambridge University Press, 101– 129.

Livingstone, D.R.; Lemaire, P.; Matthews, A.; Peters, L.D.; Porte, C.; Fitzpatrick, P.J.; Förlin, L.; Nasci, C.; Fossato, V.; Wooton, N.; Goldfarb, P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies. *Marine Environmental Research* 39: 235-240.

Livingstone, D.R.; Martinez, G.P.; Winston, G.W., 1989. Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 15: 213-236.

Livingstone, D.R.; Moore, M.N.; Lowe, D.M., Nasci, C.; Farrar, S.V., 1985. Responses of the cytochrome P450 monooxygenase system to diesel oil in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. *Aquatic Toxicology*, 7: 79-91.

Livingstone, D.R.; Nasci, C.; Solé, M.; Da Ros, L.; O'Hara, S.C.M.; Peters, L.D.; Fossato, V.; Wooton, A.N.; Goldfarb, P.S., 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquatic Toxicology*, 38: 205-224.

Livingstone, D.R.; Pipe, K., 1992. Mussel and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In: Gosling, E. (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier Science Publishers., 425-464.

Lopes, B.; Bebianno, M.J., 2007. Impact of PAH levels on CYP450 in *Mytilus galloprovincialis* from the South Coast of Portugal. *Marine Environmental Research*, 66 (1): 32 - 32.

Lopes, B.M.; Bebianno, M.J.; 2001. Variação da concentração de hidrocarbonetos alifáticos em mexilhões ao longo da costa Algarvia. *VI Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa, XII Semana da Geoquímica*, Faro, 402-404.

Lopes, B.M.; Bebianno, M.J.; Ferreira, A.M., 1999. Distribuição de *n*-alcanos em mexilhões da costa Algarvia. *6ª Conferência Nacional Sobre a Qualidade do Ambiente, 4º Vol.*, Lisboa.

Lopes, B.M.; Bebianno, M.J.; Ferreira, A.M., 2000. Concentrações de Hidrocarbonetos Alifáticos em mexilhões da Ria Formosa. *3º Congresso Ibérico de Contaminação e Toxicologia Ambiental*. Faro.

Lowe, D.M., 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 91-100

Lowe, D.M.; Clark, K.R., 1989. Contaminant induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 15: 345-358.

Lowe, D.M.; Moore, M.N.; Clark, K.R., 1981. Effects of oil in the digestive cells in mussel: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1: 213-226.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J; Farr, A.L.; Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

Malins, D.C.; Krahn, M.M.; Brown, D.W.; MacLeod, W.D.; Collier, T.K., 1980. Analysis for petroleum products in marine environments. *Helgoländer Meeresunters*, 33: 257-271.

Marigómez, I.; Soto, M.; Cancio, I.; Orbea, A.; Garmendia, L.; Cajaraville M.P., 2006. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the *Prestige* oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 287–304

Martínez-Goméz, C.; Campillo, J.A.; Benedicto, J.; Fernández, B.; Valdés, J.; Garcia, I.; Sánchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the *Prestige* oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 53: 305–314

McErloy, A.E.; Farrington, J.W.; Teal, J.M., 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *In*: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press. 1-40.

Michel, X.; Salaun, J.P.; Galgani, F.; Narbonne, J.F., 1994. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. *Marine Environmental Research*, 38: 257–273.

Michel, X.R.; Cassand, P.M.; Ribera, D.G.; Narbonne, J.F., 1992. Metabolism and mutagenic activation of benzo[a]pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 103: 43-51.

- Michel, X.R.; Suteau, P.; Robertson, L.W.; Narbornne, J.F., 1993. Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'tetrachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolising enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic Toxicology*, 27: 335-34
- Mille, G.; Asia, L.; Guiliano, M.; Malleret, L.; Doumenq, P., 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Marine Pollution Bulletin*, 54: 566–575.
- Mille, G.; Guiliano, M.; Asia, L.; Malleret, L.; Jalaluddin, N., 2006. Sources of hydrocarbons in sediments of the Bay of Fort de France (Martinique). *Chemosphere*, 64: 1062–1073
- Monteiro, L.S.; Gouveia, J.V., 2005. Novos Esquemas de Separação de Tráfego na Costa Portuguesa. *Revista da Marinha*, 2: 35-41. (disponível em http://www.marinha.pt/extra/revista/ra_fev2005)
- Monteiro, M.; Quintaneiro, C.; Nogueira, A.J.A.; Morgado, F.; Soares, A.M.V.M.; Guilhermino, L., 2006. Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. *Chemosphere*,
- Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 134-139.
- Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 81-89.
- Moore, M.N.; Livingstone, D.R.; Widdows, J., 1989. Hydrocarbons in marine molluscs: biological effects and ecological consequences. In: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press. 291-328.
- Moore, M.N.; Livingstone, D.R.; Widdows, J.; Lowe, D.M.; Pipe, R.K., 1987. Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *The Philosophical Transactions of the Royal Society*, 316: 603-623.

Moore, M.N.; Lowe, D.M., 1985. Cytological and cytochemical measurements. In: Bayne, B.L. *et al.* (Eds.), The effects of stress and pollution on marine animals. Preager Publishers, New York. 46-74.

Moran, J.; Morgan, M.; Wiersma, J., 1980. Introduction to environmental science. W. H. Freeman and Company, 658 p.

Morcillo, Y.; Porte, C., 2000. Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*, 107: 47-52

Moreira, S.; Moreira-Santos, M.; Ribeiro, R.; Guilhermino, L., 2004. The 'Coral Bulker' fuel oil spill on the North Coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, 13: 619–630.

Morgado, M.E.; Bebianno; M.J., 2005. A mussel watch in the Ria Formosa lagoon. *Ciências Marinas*, 31(1B): 231–241.

Mudge, S.M., 2002. Aspects of hydrocarbon fingerprinting using PLS - new data from Prince William Sound. *Environmental Forensics*, 3: 323-329.

Naes, K.; Knutzen, J.; Berglind, L., 1995. Occurrence of PAH in marine organisms and sediments from smelter discharge in Norway. *The Science of the Total Environment*, 163: 93-106.

Näf, C.; Broman, D.; Axelman, J., 1994. Characterization of the PAH load outside an aluminium smelter on the Swedish Baltic coast. *The Science of the Total Environment*, 156:109-118.

Narbonne J.F.; Garrigues, P.; Ribera, D.; Raoux, C.; Mathieu, A.; Lemaire, P.; Salaun, J.P.; Lafaurie, M., 1991. Mixed function oxygenases enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 37–42.

Narbonne, J.F.; Michel, X.; Lafaurie, M.; Garrigues, P., 1996. Cytochrome P450 activities in mussel and fish from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated

environment: field studies of the French coast of the Mediterranean sea. *Marine Environmental Research*, 42(1-4): 277-278.

Nasci, C.; Nesto, N.; Monteduro, R.A.; Da Ros, L., 2002. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Marine Environmental Research*, 54: 811– 816.

Nasci, C.; Ros, L.; Campesan, G.; Vleet, E.S.; Salizzato, M.; Sperti, L.; Pavoni, B., 1999. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12): 255-260.

Neff, J.M., 2002. Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier Science, Amsterdam. 439 p.

Neff, J.M.; Ostazeski, S.A.; Macomber, S.C.; Roberts, L.G.; Gardiner, W.; Word, J.Q., 1998. Weathering, chemical composition and toxicity of four Western Australian crude oils. Report to Apache Energy Ltd., Perth, Western Australia, Australia.

Nitta, T., 1972. Marine pollution in Japan. *In*: Ruivo, M. (Ed.), Marine pollution and sea life. FAO, Fishing News (Books), Ltd., 77-81.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), 1995. NOAA National Status & Trends Program Mollusk Chemistry Data. Tissue Chemistry Data 86-93. ASCII text file. National Oceanic and Atmospheric Administration, Rockville, MD.

Orbea, A.; Marigomez, I.; Fernandez, C.; Tarazona, J.V.; Cancio, I.; Cajaraville, M. P., 1999. Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content in mussels from two Basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2): 158-166.

Orbea, A.; Montoya, J.; Saitua, E.; Cajaraville, M.P., 2000. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in transplanted mussels as biomarkers of organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126 A: 113-113.

Orbea, A.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Solé, M.; Porte, C.; Cajaraville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*, 58: 75-98.

Oros, D.R.; Abas, M.R.; Omar, N.Y.; Rahman, N.A.; Simoneit, B.R., 2006. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning: Part 3. Grasses. *Applied Geochemistry*, 21: 919–940

Oros, D.R.; Ross, J.R.M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Estuary sediments. *Marine Chemistry*, 86: 169–184.

Oros, D.R.; Ross, J.R.M., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: spatial distributions, temporal trends, and sources (1993–2001). *Marine Environmental Research* 60, 466–488.

OSPAR (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic) Commission 2000. Quality Status Report 2000: Region IV – Bay of Biscay and Iberian Coast. OSPAR Commission, London. 134 p

OSPAR (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic) Commission, 2001. Hazardous substances series. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). OSPAR Commission, London. 27 p.

Page, D.S.; Bence, A.E.; Burns, W.A.; Boehm, P.D.; Brown, J.S.; Douglas, G.S., 2002a. A holistic approach to hydrocarbon source allocation in the subtidal sediments of Prince William Sound, Alaska, Embayments. *Environmental Forensics*, 3: 331–340.

Page, D.S.; Boehm, P.D.; Brown, J.S.; Neff, J.M.; Burns, W.A.; Bence, A.E., 2005. Mussels document loss of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and the return to baseline conditions for oiled shorelines in Prince William Sound, Alaska *Marine Environmental Research*, 60: 422–436

Page, D.S.; Boehm, P.D.; Douglas, G.S.; Bence, A.E.; Burns, W.A.; Mankiewicz, P.J., 1998. Petroleum sources in the western Gulf of Alaska/Shelikoff Strait area. *Marine Pollution Bulletin*, 36(12): 1004-1012.

Page, D.S.; Boehm, P.D.; Douglas, G.S.; Bence, E.A.; Burns, W.A.; Mankiewicz, P.J., 1999. Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin*, 38: 247–260.

Page, D.S.; Boehm, P.D.; Stubblefield, W.A.; Parker, K.R.; Gilfillan, E.S.; Neff, J.M.; Maki, A.W., 2002b. Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1438–1450.

Page, D.S.; Brown, J.S.; Boehm, P.D.; Bence, A.E.; Neff, J.M., 2006. A hierarchical approach measures the aerial extent and concentration levels of PAH-contaminated shoreline sediments at historic industrial sites in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin* 52: 367–379

Page, D.S.; Huggett, R.J.; Stegeman, J.J.; Parker, K.R.; Woodin, B.; Brown, J.S.; Bence, A.E., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbon sources related to biomarker levels in fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska. *Environmental Science and Technology*, 38: 4928–4936.

Pastor, D.; Sanchez, J.; Porte, C.; Albaigés, J., 2001. The *Aegean Sea* oil spill in the Galicia coast (NW Spain). I: Distribution and fate of the crude oil and combustion products in subtidal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 42(10): 895-904.

Peña-Méndez, E.M.; Astorga-España, M.S.; García Montelongo, F.J., 2001. Chemical fingerprinting applied to evaluation of marine oil pollution in the coast of Canary Islands (Spain). *Environmental Pollution*, 111: 177–187.

Pereira, W.E.; Hostettler, F.D.; Rapp, J.B., 1992. Bioaccumulation of hydrocarbons derived from terrestrial and anthropogenic sources in the Asian clam, *Potamocorbula amurensis*, in San Francisco Bay estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 24 (2): 103-109

Pérès, J.M.; Bellau, G., 1972. Aperçu sur l'influence des pollutions sur les peuplements benthiques. In: Ruivo, M. (Ed.), *Marine pollution and sea life*. FAO, Fishing News (Books), Ltd., 375-386.

Pérez-Cadahía B, Laffon B, Pásaro E, Méndez J (2004) Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138 C: 453-460.

Peters, L.D.; Shaw, J.P.; Nott, M.; O'Hara, S.C.M.; Livingstone, D.R., 1999. Development of cytochrome P450 as a biomarker of organic pollution in *Mytilus* sp.: field studies in United Kingdom ('Sea Empress' oil spill) and the Mediterranean Sea. *Biomarkers*, 4(6): 425-441.

Piccardo, M.T.; Coradeghini, R.; Valerio, F., 2001. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution in Native and Caged Mussels, *Marine Pollution Bulletin*, 42: 951–956.

Pipe, R.K.; Porte, C.; Livingstone, D.R., 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 3 (3): 221-233

Pittinger, C.A.; Buikema, A.L.; Hornor, S.G.; Young, R.W., 1985. Variation in tissue burdens of polycyclic aromatic hydrocarbons in indigenous and relocated oysters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4: 379-387.

Porte, C.; Albaigés, J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26: 273-281.

Porte, C.; Biosca, X.; Pastor, D.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000 a. The Aegean Sea oil spill. II: Temporal study of the hydrocarbons accumulation in bivalves. *Environmental Science and Technology*, 34(24): 5067-5075.

Porte, C.; Biosca, X.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000 b. The Aegean Sea oil spill on the Galician Coast (NW Spain). III: The assessment of long-term sublethal effects on mussels. *Biomarkers*, 5 (6): 436–446

Porte, C.; Biosca, X.; Solé, M.; Albaigés, J., 2001 a. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environmental Pollution*, 112: 261-268

Porte, C.; Biosca, X.; Solé, M.; Pastor, D.; Albaigés, J., 1996. The Aegean Sea oil spill one year after: petroleum hydrocarbons and biochemical responses in marine bivalves. *Marine Environmental Research*, 42(1-4): 404-405.

Porte, C.; Escartin, E.; Garcia, L.M.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000 c. Xenobiotic metabolising enzymes and antioxidant defences in deep-sea fish: relationship with contaminant body burden. *Marine Ecology Progress Series*, 192: 259-266.

Porte, C.; Solé, M.; Albaigés, J.; Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 100 (1/2): 183-186

Porte, C.; Solé, M.; Borgi, V.; Martinez, M.; Chamorro, J.; Torreblanca, A.; Ortiz, M.; Orbea, A.; Soto, M.; Cajaraville, M.P., 2001 b. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. *Biomarkers*, 6(5): 335-350

Porter, T.D., 2002. The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(6): 311-316.

Qualls, C.W.; Lubet, R.A.; Lochmiller, R.L.; Elangbam, C.S.; Lish, J.W.; Nims, R.W., 1998. Cytochrome P450 induction in feral Cricetid rodents: a review of field and laboratory investigations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121C: 55-63.

Rattner, B.A.; Hofman, D.J.; Marn, C.M., 1989. Use of mixed-function oxygenase to monitor contaminant exposure in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1093-1102.

Readman, J.W.; Fillmann, G.; Tolosa, I.; Bartocci, J.; Villeneuve, J.P.; Catinni, 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.

Rhead, M.M.; Hardy, S.A., 2003. The sources of polycyclic aromatic compounds in diesel engine emissions. *Fuel*, 82:385-393.

Roméo, M.; Hoarau, P.; Garello, G.; Gnassia-Barelli, M.; Girard, J.P., 2003 a. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122: 369-379.

Roméo, M.; Mourgaud, Y.; Geffard, A.; Gnassia-Barelli, M.; Amiard, J.C.; Budzinski, H., 2003 b. Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. *Environmental Toxicology*, 18: 295-305.

Rowland, S.; Donkin, P.; Smith, E.; Wraige, E., 2001. Aromatic hydrocarbon “humps” in the marine environment: unrecognized toxins? *Environmental Science and Technology*, 35: 2640-2644

Schenkman, J.B.; Jansson, I., 2003. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology & Therapeutics*, 97: 139– 152

Schratzberger, M.; Daniel, F.; Wall, M.; Kilbride, R.; Macnaughton, S.J.; Boyd, S.E.; Rees, H.L.; Lee, K.; Swannell, R.P.J., 2003. Response of estuarine meio- and macrofauna to *in situ* bioremediation of oil-contaminated sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 430-443

Serafim, A.; Lopes, B.; Company, R.; Ferreira, A.M.; Bebianno, M.J., 2008. Comparative petroleum hydrocarbons levels and biochemical responses in mussels from hydrothermal vents (*Bathymodiulus azoricus*) and coastal environments (*Mytilus galloprovincialis*). *Marine Pollution Bulletin*, 57: 529–537

Serafim, M.A.; Bebianno, M.J., 2001. Variation of Metallothionein and Metal Concentrations in the Digestive Gland of the Clam *Ruditapes decussatus*: Sex and Seasonal Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3): 544-552.

Shaw, J.P.; Large, A.T.; Donkin, P.; Evans, S.V.; Staff, F.J.; Livingstone, D.R.; Chipman, J.K.; Peters, L.D., 2004. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 67: 325-336.

Shaw, J.P.; Large, A.T.; Livingstone, D.R.; Doyotte, A.; Renger, J.; Chipman, J.K.; Peters, L.D., 2002. Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Marine Environmental Research*, 54: 505–509

Shchekaturina, T.L.; Khesina, A.L.; Mironov, O.G.; Krivosheeva, J.G., 1995. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel from the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (1): 38-40

Shimakata, T.; Mihara, V.; Sato, R., 1972. Reconstitution of hepatic microsomal stearyl-coenzyme A desaturase system from solubilized components. *Journal of Biochemistry*, 72: 1163-1174.

Snedaker, S.C.; Glynn, P.W.; Rumbold, D.G.; Corcoran, E.F., 1995. Distribution of *n*-alkanes in marine samples from southeast Florida. *Marine Pollution Bulletin*, 30: 83–89.

Snyder, M.J., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48(4): 529-547.

Soclo, H.H.; Garrigues, P.H.; Ewald, M., 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 387–396.

Solé, M., 2000 a. Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (1): 1-9

Solé, M., 2000 b. Effects of tributyltin on the MFO system of the clam *Ruditapes decussata*: a laboratory and field approach. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 125: 93–101

Solé, M.; Buet, A.; Ortiz, L.; Maynou, F.; Bayona, J.M.; Albaigés, J., 2007. Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. *Scientia Marina*, 71(2): 373-382.

Solé, M.; Lima, D.; Reis-Henriques, M.A.; Santos, M.M., 2008. Stress biomarkers in juvenile senegal Sole, *Solea senegalensis*, exposed to the water-accommodated fraction of the “Prestige” fuel oil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80: 19–23.

Solé, M.; Livingstone, D.R., 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and FNADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase-activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141 C: 20 – 31

Solé, M.; Nasi, C.; Livingstone, D.R., 2000 a. Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) from the Venice Lagoon, Italy: responses of CYP1A-immunopositive protein and benzo(a)pyrene hydroxylase activity. *Biomarkers*, 5 (2): 129–140

Solé, M.; Peters, L.D.; Magnusson, K.; Sjölin, A.; Granmo, Å.; Livingstone, D.R., 1998. Responses of the cytochrome P450-dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat. *Biomarkers*, 3, 49–62.

Solé, M.; Porte, C.; Albaigés, J., 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology*, 30: 271-283.

Solé, M.; Porte, C.; Albaigés, J., 1995 a. Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (1): 157-164

Solé, M.; Porte, C.; Albaigés, J., 1995 b. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels combined with the biological effects of organic pollution on mussels *The Science of the Total Environment*, 159: 147-153

Solé, M.; Porte, C.; Barceló D.; Albaigés, J., 2000 b. Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean) *Marine Pollution Bulletin*, 40 (9): 746-753

Solé, M.; Porte, C.; Biosca, X.; Mitchelmore, C.L.; Chipman, J.K.; Livingstone, D.R.; Albaigés, J., 1996. Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemical Physiology*, 113C, (2): 257-265

Solé, M.; Raldua, D.; Piferrer, F.; Barceló, D.; Porte, C., 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136 C: 145–156

Soriano, JA; Viñas, L; Franco, MA; González, JJ; Ortiz, L; Bayona, JM; Albaigés, J, 2006. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the *Prestige* oil spill. *The Science of the Total Environment*, 370: 80-90.

Spacie, A.; McCarty, L.S.; Rand, G.M., 1995. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In: Rand, G.M. (Ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. 2nd Ed., Taylor & Francis, Washington, 493-521.

Sprovieri, M.; Feo, ML.; Prevedello, L.; Manta, DS.; Sammartino, S.; Tamburrino, S.; Marsella, E., 2007. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*, 67: 998–1009.

Spry, J.A.; Livingstone, D.R.; Wiseman, A.; Gibson, G.G.; Goldfarb, P.S., 1989. Cytochrome P-450 gene expression in the common mussel *Mytilus edulis*. *Biochemical Society Transactions*, 17: 1013-1014.

Stegeman, J.J., 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve molluscs species from the Western North Atlantic. *Marine Biology*, 89: 21-30.

Stegeman J.J.; Livingstone, D.R., 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 121: 1-3.

Stella, A.; Piccardo, M.T.; Coradeghini R.; Redaelli, A.; Lanteri, S.; Armandino, C.; Valério, F., 2002. Principal components analysis application in polycyclic aromatic hydrocarbons “mussel watch” analyses for source identification. *Analytica Chimica Acta*, 461: 201-213

Suteau, P.M.; Narbonne, JF, 1988. Preliminary data on PAH metabolism in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* from Arcachon Bay, France. *Marine Biology*, 98: 421-425

Ter Braak, C.J.F., 1995. Ordination. *In*: Jongman, R.H.G., Ter Braak, C.J.F., Van Tongeren, O.F.R. (Eds.), *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 91–173 p.

Tolosa, I.; Mora, S.J.; Fowler, S.W.; Villeneuve, J-P; Bartocci, J.; Cattini, C., 2005. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1619–1633

UNEP (United Nations Environmental Programme) *Chemicals*, 2002. Mediterranean regional report. Regionally based assessment of persistent toxic substances. 149 p.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1976. Quality criteria for water. U.S.E.P.A., Washington, 111-122.

Utvik, T.I., 1999. Chemical characterization of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. *Chemosphere* 39: 2593-2606.

Utvik, T.I.; Durell, G.S.; Johnsen, S., 1999. Determining produced water originating polycyclic aromatic hydrocarbons in North Sea waters: comparison of sampling techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 38:977-989.

van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

van der Oost, R.; Heida, H.; Opperhuizen, A.; Vermeulen, N.P.E., 1991. Bioaccumulation of organic micropollutants in different aquatic organisms: sublethal toxic effects on fish. *In*: Mayes, M.A. & Barron, M.G. (Ed.), *Aquatic toxicology and*

risk assessment: fourteenth volume. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 166-180.

Varanasi, U.; Chan, S-L.; MacLeod, W.D.; Stein, J.E.; Brown, D.W.; Burrows, D.G.; Tilbury, K.L.; Landahl, J.L.; Wigren, C.A.; Hom, T.; Pierce, S.M., 1990. Survey of Subsistence Fish and Shellfish for Exposure to Oil Spilled from the *EXXON VALDEZ* (Cycles I - III). Environmental Conservation Division, Northwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, Seattle, WA.

Vasquez, M.A.; Allen, K.W.; Kattan, Y.M., 2000. Long-term effects of the 1991 Gulf War on the hydrocarbons levels in clams at selected areas of the Saudi Arabian Gulf coastline. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (5): 440-448

Venier, P.; Canova, S., 1996. Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology*, 34: 119-133.

Vermulen, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. *In*: Ioannides, C. (Ed), Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects. CRC Press, 411 p.

Viarengo, A.; Canesi, L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94: 225-243.

Viarengo, A.; Canesi, L.; Garcia Martinez, P.; Peters, L.D.; Livingstone, D.R., 1995. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111B(1): 119-126.

Walker, C.H., 1995. Biochemical biomarkers in ecotoxicology: some recent developments. *The Science of the Total Environment*, 171: 189-195

Walker, C.H., 1998. Avian forms of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 121C: 65-72

Wang, Z.; Fingas, M.; Page, D.S., 1999 a. Review: oil spill identification. *Journal of Chromatography*, A, 843: 369-411.

- Wang, Z.; Fingas, M.; Shu, Y.Y.; Sigouin, L.; Landriault, M.; Lambert, P.; Turpin, R.; Campagna, P.; Mullin, J., 1999 b. Quantitative characterization of PAHs in burn residue and soot samples and differentiation of pyrogenic PAHs from petrogenic PAHs—the 1994 mobile burn study. *Environmental Science and Technology*, 33: 3100–3109.
- Wenning, R.J.; Di Giulio, R.T., 1988. Microsomal enzyme activities, superoxide production and antioxidant defences in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 90 (1): 21-28.
- Wetzel, D.L.; van Vleet, E.S., 2003. Persistence of petroleum hydrocarbon contamination in sediments of the canals in Venice, Italy: 1995 and 1998. *Marine Pollution Bulletin*, 46:1015–1023
- Wetzel, D.L.; van Vleet, E.S., 2004. Accumulation and distribution of petroleum hydrocarbons found in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 927–936.
- Widdows, J.; Donkin, P., 1992. Mussel and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling, E. (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier Science Publishers., 383-424.
- Williams, P.T.; Bartle, K.D.; Andrews, G.E., 1986. The relation between polycyclic aromatic compounds in diesel fuels and exhaust particulates. *Fuel*, 65: 1150–1158
- Winston, G.W.; Livingstone, D.R.; Lips, F., 1990. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Zoology*, 255: 296-308.
- Witt, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12): 237-248.
- Yawetz, A.; Manelis, R.; Fishelson, L., 1992. The effects of Aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of Mediterranean molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103C, 607–614.

Yeats, P.; Gagné, F.; Hellou, J., 2008. Body burden of contaminants and biological effects in mussels: an integrated approach. *Environment International* 34: 254–264

Yim, U.H.; Oh, J.R.; Hong, S.H.; Lee, S.H.; Shim, W.J., 2002. Identification of PAHs sources in bivalves and sediments 5 years after the *Sea Prince* oil spill in Korea. *Environmental Forensics*, 3: 357-366.

Yunker, M.B.; Backus, S.M.; Pannatier, EG.; Jeffries, DS; Macdonald, RW., 2002 a. Sources and significance of alkane and PAH hydrocarbons in Canadian Arctic rivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55: 1–31.

Yunker, M.B.; Macdonald, R.W.; Vingarzan, R.; Mitchell, R.H.; Goyette, D.; Sylvestre, S., 2002 b. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33: 489–515.

Yunker, M.B.; Snowdon, L.R.; Macdonald, R.W.; Smith, J.N.; Fowler, M.G.; Skibo, D.N.; McLaughlin, F.A.; Danyushevskaya, A.I.; Petrova, V.I.; Ivanov, G.I., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon composition and potential sources for sediment samples from the Beaufort and Barents Seas. *Environmental Science and Technology*, 30: 1310–1320.

Zang, H.; Myshkin, E.; Waskell, L., 2005. Role of cytochrome b₅ in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 499-506.

Zorita, I.; Apraiz, I.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Orbea, A.; Cancio, I.; Soto, M.; Marigoómez, I.; Cajaraville, M.P., 2007. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, 148: 236-250.

ANEXO

Tabela A1 – Razões diagnóstico nos tecidos de *M. galloprovincialis*.

Estação	Locais	Fen/Ant	Flu/Pir	Ant/Ant+Fen	Flu/Flu + Pir	BaA/BaA+Cris	IndP/IndP+Bper
Inverno I	SG	4,23	0,71	0,19	0,42	0,65	0,21
	LG	2,23	1,15	0,31	0,53	0,57	0,33
	PT	2,98	2,39	0,25	0,70	0,65	0,42
	VM	2,23	3,83	0,31	0,79	0,73	0,41
	FR	11,03	0,67	0,08	0,40	0,69	0,52
	OL	5,00	3,07	0,17	0,75	0,55	0,26
	TV	0,66	0,68	0,60	0,40	0,47	0,17
	VR	6,64	0,88	0,13	0,47	0,63	0,22
Primavera	SG	4,53	0,52	0,18	0,34	0,47	0,37
	LG	4,62	1,31	0,18	0,57	0,78	0,25
	PT	1,16	1,98	0,46	0,66	0,18	0,55
	VM	1,61	1,96	0,38	0,66	0,33	0,46
	FR	16,68	0,59	0,06	0,37	0,66	0,30
	OL	8,00	2,00	0,11	0,70	0,27	0,18
	TV	4,78	2,18	0,17	0,69	0,68	0,53
	VR	14,24	0,36	0,07	0,27	0,86	0,78
Verão	SG	2,47	1,09	0,29	0,52	0,68	0,35
	LG	10,14	0,81	0,09	0,45	0,44	0,25
	PT	0,75	1,06	0,57	0,52	0,62	0,45
	VM	2,40	3,06	0,29	0,75	0,66	0,31
	FR	11,95	0,52	0,08	0,34	0,59	0,54
	OL	0,60	1,72	0,63	0,63	0,56	0,46
	TV	5,03	0,55	0,17	0,35	0,62	0,26
	VR	2,73	0,25	0,27	0,20	0,64	0,43
Outono	SG	3,82	0,64	0,21	0,39	0,67	0,28
	LG	5,70	0,37	0,15	0,27	0,62	0,54
	PT	5,23	0,90	0,16	0,47	0,63	0,24
	VM	3,69	1,62	0,21	0,62	0,70	0,43
	FR	6,17	0,11	0,14	0,10	0,34	0,24
	OL	1,78	1,21	0,36	0,55	0,71	0,27
	TV	7,67	0,56	0,12	0,36	0,72	0,37
	VR	2,23	1,57	0,31	0,61	0,55	0,24
Inverno II	SG	4,29	0,74	0,19	0,42	0,76	0,56
	LG	2,51	0,20	0,29	0,16	0,73	0,35
	PT	2,92	1,50	0,25	0,60	0,60	0,44
	VM	2,76	1,14	0,27	0,53	0,66	0,44
	FR	3,22	0,30	0,24	0,23	0,42	0,28
	OL	4,88	3,36	0,17	0,77	0,73	0,24
	TV	4,32	1,29	0,19	0,56	0,44	0,39
	VR	2,35	0,65	0,30	0,39	0,56	0,35
Inverno III	SG	1,87	0,44	0,35	0,30	0,58	0,50
	LG	1,05	0,73	0,49	0,42	0,55	0,24
	PT	0,74	1,56	0,58	0,61	0,51	0,47
	VM	1,60	1,91	0,38	0,66	0,74	0,39
	FR	2,27	0,74	0,31	0,43	0,63	0,44
	OL	1,45	1,65	0,41	0,62	0,63	0,37
	TV	1,68	1,84	0,37	0,65	0,38	0,17
	VR	11,98	0,59	0,08	0,37	0,35	0,26

Fen – fenantreno; Ant – antraceno; Flu – fluoranteno; Pir – pireno; BaA – benzo(a)antraceno; Cris – criseno; IndP – indeno(1,2,3 cd)pireno; BPer – benzo(ghi)perileno

Tabela A2 – Concentração de PAH individuais em amostras ou média de amostras que definem as assinaturas de PAH utilizadas

PAH	1*	2**	3**	4**	5**	6**	7**	8**	9**	10**	11**	12*	13**	14**	15**	16***	17***	18*	19*	20*	21**	22**
	FEX	VLW	LW	MW	HW	VHW	EHW	HS	HSED	WS	WB	AD	A2D	BOF	BPC	NAD	NAP	OIL	CRE	COAL	CTAR	MTAR
N	622	43	--	--	0,9	3,6	--	4	--	160	45	745	1292	67	7,84	--	--	423	60274	21	--	1
Acftil	--	--	--	--	--	--	--	1	--	130	7	--	<5	4	--	--	--	--	5248	--	--	--
Acften	2	--	--	--	--	--	--	0,4	--	13	62	--	--	--	--	--	--	13,9	22699	--	--	3
Flr	93	120	950	--	1,2	--	--	1	--	85	129	449	571	29	1,76	--	--	73,6	18774	1,8	--	4
Fen	262	340	3900	66	6,1	9,6	9,9	7	1869	1200	1039	1330	945	111	7,84	0,4	0,0018	177	44572	18	10300	27
Ant	--	--	--	31	--	--	--	2	446	240	162	59	19	8	1,18	--	--	3,4	7073	3,7	2700	3
Flu	2	--	--	26	7,3	--	--	20	3183	3700	1467	--	36	8	--	0,11	0,0019	3,9	20232	3,2	10800	26
Pir	10	13	390	35	--	--	--	19	2804	4600	1167	27	83	12	1,96	0,074	0,0013	15,5	21131	3,5	7120	27
BaA	2	9,3	--	--	--	--	--	15	1596	4300	469	--	2,9	9	--	0,006	0,0005	5,5	5149	4,4	5000	6
Cris	46	110	3000	530	190	55	36	16	1756	5100	755	2	41	22	--	0,002	0,0018	28,5	4108	3,2	nd	13
BbF	6	3,5	390	--	29	13	9,4	15	2769	10000	1135	--	1,5	6	1,18	0,0075	0,0025	3,9	2414	3	6490	6
BkF	--	16	--	--	--	--	--	14	--	2300	--	--	0,4	1	--	--	--	0,46	2159	--	6490	1
BaP	--	22	770	140	2,5	7,5	4,4	20	1607	6800	492	--	0,4	4	--	0,0015	0,0005	2	2222	3,1	3290	2
DahA	1	--	--	--	5,3	--	--	4	247	680	196	--	<0,2	1	--	--	--	1	208	--	672	2
BPer	2	5,3	150	37	21	25	8,8	12	1028	4500	503	--	0,2	4	--	0,0004	0,0005	1,53	574	1,8	1770	4
IndP	1	--	--	--	--	--	--	11	1296	5200	436	--	<0,2	1	--	0,0004	0,0005	0,06	718	0,53	2730	1

* - mg/kg; ** - ng/g; *** - ng/L

Assinatura 1 - Petróleo (crude) "Alaskan North Slope" fresco (FEX) (Burns *et al*, 1997).

Assinaturas 2 a 7 - PAH encontrados em sedimentos contaminados pelo derrame do "Exxon Valdez", no Alasca, sujeitos a diferentes graus de degradação ambiental: "very lightly weathered" (VLW); "lightly weathered" (LW); "moderately weathered" (MW), "heavily weathered" (HW), "very heavily weathered" (VHW) e "extremely heavily weathered" (EHW) (Burns *et al*, 1997; Page *et al*, 1999).

Assinatura 8 - PAH em sedimentos afectados por produtos de combustão provenientes das habitações (habitation soot - HS) (Burns *et al*, 1997).

Assinatura 9 - PAH em sedimentos recolhidas no porto de Ajaccio (Córsega), severamente expostos a PAH derivados do tráfego marítimo (HSED) (Baumard *et al*, 1998d).

Assinatura 10 - PAH encontrados em cinzas (wood soot - WS) lançadas durante fogos florestais de pinheiro e carvalho (Burns *et al*, 1997).

Assinatura 11 - PAH derivados da combustão de madeira (coníferas) (wood burning - WB) (Page *et al*, 1999).

Assinatura 12 - "Alaska" diesel oil (AD) (Burns *et al*, 1997).

Assinatura 13 - A2 diesel fuel (A2D) (Rhead e Hardy 2003).

Assinaturas 14 e 15 - Níveis basais de PAH recolhidos em sedimentos ao largo de Yakataga (BOF) e Port Chalmers (BPC), ambos no Alasca (Burns *et al*, 1997).

Assinaturas 16 e 17 - PAH recolhidos em amostras de água do Atlântico Norte na fracção dissolvida (NAD) e na fracção particulada (NAP) (Lipiatou *et al*, 1997).

Assinatura 18 - Média de PAH analisados em 60 amostras de crude (OIL) (Kerr *et al*, 2001).

Assinatura 19 - Creosoto utilizado na preservação de madeiras (serrações, estaleiros, móveis) (CRE) (Neff *et al*, 1998 a,b).

Assinaturas 20 e 21 - PAH recolhidos em amostras de carvão (COAL) (Neff, et al 1998) e carvão queimado (CTAR). (Baumard *et al*, 1998 a)

Assinatura 22 - Média de PAH encontrados em três amostras de alcatrão recolhido nas praias de Peak Island (Monterey tar - MTAR) (Page *et al*, 1999).

Tabela A3 – Concentrações e actividades dos componentes do sistema MFO, durante todo o período em estudo.

Mês	Local	CYP450 (pmol/mg prot)	P418 (ua/mg prot)	NADPH-red (nmol/min/mg prot)	Citocromo b ₅ (pmol/mg prot)	NADH-red (nmol/min/mg prot)
Inverno I	SG	23,9 ± 3,8	4,7 ± 1,0	5,0 ± 1,1	10,5 ± 1,8	23,0 ± 3,3
	LG	24,0 ± 3,7	5,5 ± 1,2	4,4 ± 0,8	21,6 ± 0,7	48,5 ± 6,8
	PT	25,7 ± 3,2	6,4 ± 0,4	7,3 ± 1,3	12,1 ± 2,2	26,5 ± 4,6
	VM	54,1 ± 10,7	7,5 ± 1,5	9,0 ± 1,3	26,6 ± 4,5	54,9 ± 6,1
	FR	25,4 ± 4,1	7,1 ± 0,2	6,5 ± 1,1	11,9 ± 1,8	35,1 ± 7,1
	OL	38,4 ± 6,3	7,4 ± 1,1	9,0 ± 1,5	12,8 ± 2,0	43,4 ± 6,7
	TV	20,2 ± 2,3	5,3 ± 0,2	4,6 ± 1,3	13,5 ± 2,6	32,0 ± 4,1
	VRSA	29,0 ± 4,6	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,7	14,0 ± 2,2	34,1 ± 2,6
Primavera	SG	15,7 ± 1,6	4,1 ± 0,3	3,1 ± 0,4	10,4 ± 1,5	20,0 ± 2,2
	LG	22,0 ± 3,6	5,2 ± 0,3	4,4 ± 0,4	18,8 ± 1,9	30,7 ± 2,4
	PT	21,3 ± 3,4	4,7 ± 0,3	4,5 ± 0,5	15,0 ± 2,0	35,5 ± 3,0
	VM	38,2 ± 5,5	5,0 ± 0,2	7,2 ± 1,0	23,8 ± 2,3	39,1 ± 5,2
	FR	17,6 ± 2,6	3,9 ± 0,5	4,9 ± 0,6	12,7 ± 1,8	21,5 ± 2,6
	OL	30,9 ± 3,5	7,5 ± 0,5	7,8 ± 1,4	21,3 ± 1,4	38,6 ± 2,3
	TV	15,6 ± 2,0	3,8 ± 0,7	6,2 ± 0,7	11,2 ± 1,9	27,1 ± 4,2
	VRSA	17,9 ± 1,0	5,2 ± 0,8	7,6 ± 0,5	12,8 ± 0,8	16,3 ± 1,2
Verão	SG	20,9 ± 1,9	3,7 ± 0,5	3,4 ± 0,6	8,0 ± 0,7	31,3 ± 5,9
	LG	26,9 ± 3,1	3,9 ± 0,4	3,2 ± 0,4	11,0 ± 0,9	30,0 ± 4,2
	PT	15,1 ± 1,7	2,6 ± 0,3	5,6 ± 0,7	8,4 ± 1,1	31,7 ± 3,4
	VM	41,2 ± 7,3	7,2 ± 1,3	9,4 ± 1,5	23,4 ± 2,5	58,9 ± 8,9
	FR	19,7 ± 2,3	5,0 ± 0,9	4,3 ± 0,4	8,5 ± 1,2	36,4 ± 6,3
	OL	29,5 ± 5,4	3,6 ± 0,5	8,0 ± 0,6	18,0 ± 2,4	43,0 ± 7,1
	TV	18,0 ± 2,3	4,2 ± 0,6	6,3 ± 0,6	16,2 ± 2,0	57,2 ± 10,4
	VRSA	21,6 ± 3,6	6,3 ± 1,2	9,2 ± 1,4	11,5 ± 0,7	51,8 ± 5,6
Outono	SG	33,2 ± 5,6	6,8 ± 1,0	12,6 ± 0,5	32,7 ± 3,1	125,2 ± 12,8
	LG	28,2 ± 4,5	5,9 ± 0,7	9,6 ± 1,4	21,0 ± 1,2	127,2 ± 15,9
	PT	57,0 ± 6,6	7,6 ± 0,7	12,0 ± 1,4	31,2 ± 1,9	126,7 ± 20,5
	VM	53,3 ± 5,6	7,8 ± 0,4	7,4 ± 1,2	27,0 ± 3,3	85,4 ± 13,6
	FR	32,7 ± 6,8	5,2 ± 0,5	3,7 ± 0,5	20,3 ± 1,2	95,6 ± 7,9
	OL	37,2 ± 2,1	4,5 ± 0,5	8,4 ± 1,3	21,0 ± 2,2	114,3 ± 13,7
	TV	31,0 ± 2,0	4,6 ± 0,7	8,1 ± 1,3	25,3 ± 2,2	92,5 ± 6,5
	VRSA	25,1 ± 1,5	5,4 ± 0,7	6,5 ± 0,9	26,6 ± 1,8	105,8 ± 7,0
Inverno II	SG	43,0 ± 1,7	9,8 ± 2,6	11,8 ± 1,1	28,0 ± 4,7	59,3 ± 3,1
	LG	35,4 ± 6,2	6,5 ± 0,3	8,6 ± 1,8	24,4 ± 3,3	73,5 ± 12,2
	PT	32,3 ± 3,9	4,3 ± 0,9	10,2 ± 2,1	17,4 ± 2,3	66,0 ± 5,4
	VM	65,3 ± 4,5	11,7 ± 1,5	13,1 ± 1,5	38,1 ± 3,0	79,7 ± 8,8
	FR	31,6 ± 2,8	6,6 ± 1,3	9,4 ± 2,4	10,9 ± 1,6	61,2 ± 7,6
	OL	56,4 ± 7,3	7,3 ± 1,8	15,8 ± 3,9	11,9 ± 1,3	56,5 ± 7,9
	TV	27,7 ± 2,1	4,1 ± 0,5	6,2 ± 1,2	10,3 ± 3,5	50,9 ± 8,2
	VRSA	44,8 ± 2,7	6,8 ± 0,6	14,8 ± 2,8	21,4 ± 3,3	54,9 ± 6,7
Inverno III	SG	47,6 ± 8,5	6,4 ± 0,9	5,9 ± 1,9	27,4 ± 1,7	35,5 ± 3,4
	LG	57,3 ± 2,5	11,7 ± 1,3	12,3 ± 1,2	53,3 ± 5,5	66,7 ± 17,3
	PT	47,5 ± 1,8	10,9 ± 1,3	11,9 ± 2,7	42,3 ± 3,4	58,2 ± 8,8
	VM	69,5 ± 8,0	16,0 ± 1,2	16,4 ± 2,1	65,2 ± 4,9	95,7 ± 6,0
	FR	65,6 ± 8,8	10,8 ± 1,7	13,3 ± 2,0	40,8 ± 4,3	62,6 ± 2,6
	OL	78,2 ± 11,8	15,7 ± 2,1	14,8 ± 2,1	78,3 ± 17,7	114,4 ± 20,7
	TV	46,1 ± 2,8	10,3 ± 1,0	13,1 ± 1,7	14,1 ± 1,6	39,5 ± 7,2
	VRSA	48,7 ± 4,0	7,3 ± 0,0	6,3 ± 1,4	14,7 ± 2,0	56,5 ± 9,9