

Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS

3º Relatório Anual – Ciclos 1 a 6

Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos de Santos



Revisão 00

E&P

Fevereiro/2019



PETROBRAS

**Projeto de Monitoramento
de Cetáceos na Bacia de Santos
PMC-BS**

3º Relatório Anual – Ciclos 1 a 6

**Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados
Orientados aos Objetivos**

**Revisão 00
Fevereiro / 2019**



E&P

ÍNDICE GERAL

LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ANEXOS	30
APRESENTAÇÃO.....	31
EQUIPE TÉCNICA EXECUTORA DO PMC-BS	32
I. INTRODUÇÃO.....	33
II. RESUMO EXECUTIVO	35
III. MÉTODOS	39
III.1 Plataformas de pesquisa	41
III.2 Avistagem Embarcada	45
III.3 Monitoramento Acústico Passivo (MAP)	47
III.4 Avistagem Aérea	53
III.5 Telemetria	57
III.6 Fotoidentificação	63
III.7 Coleta de biópsias	65
IV. ESFORÇO E TAMANHO AMOSTRAL POR ÁREA TEMÁTICA.....	68
IV.1 Avistagem Embarcada	72
IV.2 Monitoramento Acústico Passivo	74
IV.3 Avistagem Aérea	78
IV.4 Telemetria	80
IV.5 Fotoidentificação	86
IV.6 Coleta de biópsias	92
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO ORIENTADA PARA OS OBJETIVOS	96
V.1 Comunidade de cetáceos.....	96
V.1.1 Composição e estrutura da comunidade de cetáceos	96
V.1.2 Identificação Molecular das Espécies	106
V.2 Distribuição, movimentos e uso de habitat	117
V.2.1 Distribuição dos cetáceos e Modelagem de habitat com inclusão de variáveis antrópicas	117
V.2.2 Movimentos - Telemetria	152

V.2.1	Movimentos - Fotoidentificação	181
V.2.2	Estrutura de populações por genética para algumas espécies..	198
V.3	Biologia populacional.....	214
V.3.1	Estimativas de densidade de cetáceos em Campanhas de Avistagem Embarcada.....	214
V.3.2	Estimativas de densidade de Delphinidae em Campanhas de Avistagem Aérea.....	228
V.3.3	Diversidade genética	237
V.3.4	Proporção Sexual	252
V.3.5	Estimativa de idade de baleia-jubarte	255
V.4	Padrões comportamentais.....	261
V.4.1	Comportamento de mergulho	261
V.4.2	Perfil de mergulho e comportamento acústico com DTAGs	289
V.4.3	Repertório acústico – cliques	305
V.4.4	Repertório acústico – assovios	333
V.5	Estado de Saúde e Grau de Contaminação	349
V.5.1	Estado de saúde por meio de análise de lesões de pele	349
V.5.2	Contaminantes orgânicos, HPA e Biomarcadores	366
VI.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	375
VI.1	Avanços obtidos em relação aos anos anteriores	375
VI.2	Avaliação Crítica dos Resultados orientada para os objetivos	377
VI.2.1	Ampliar o grau de conhecimento sobre a riqueza e a distribuição de espécies de cetáceos na Bacia de Santos.	377
VI.2.2	Estimar a densidade e a abundância das espécies de cetáceos mais comuns na Bacia de Santos, por meio da implementação e avaliação de métodos complementares.....	378
VI.2.3	Levantar informações sobre o uso de habitats de algumas espécies, implementando diferentes métodos conjuntamente e testando a eficácia dos mesmos.....	378
VI.2.4	Obter informações sobre padrões comportamentais de algumas espécies, buscando avaliar, quando possível, a suscetibilidade destas diante de atividades antrópicas.	379

VI.2.5 Avaliar o grau de contaminação existente em diferentes espécies de cetáceos por diferentes tipos de agentes químicos.	380
VI.2.6 Avaliar o estado de saúde de cetáceos, por meio de registro de lesões epidérmicas ou traumas, que possam ser identificados pela aplicação da técnica de foto-identificação.	380
VI.2.7 Promover o registro e a avaliação preliminar de possíveis interferências antrópicas na comunidade de cetáceos na Bacia de Santos.....	380
VI.2.8 Avaliar a funcionalidade e a eficácia da aplicação integrada e complementar dos diversos métodos previstos para o atendimento dos objetivos de monitoramento.	381
VI.3 Avaliação de aspectos antrópicos	381
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	383
VIII. ANEXOS.....	428

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1-1: Resumo do esforço e tamanho amostral nas Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS.....	73
Tabela IV.2-1: Resumo do esforço e tamanho amostral nas Campanhas de MAP do PMC-BS.....	76
Tabela IV.2-2: Lista do número total de arquivos de áudio e volume do PAMGUARD e do ISHMAEL separados por ciclo e o total para os três anos de PMC-BS. ISH = gravações do programa ISHMAEL. PAM = gravações do programa PAMGUARD.....	77
Tabela IV.2-3: Número de registros acústicos realizados durante os três anos do PMC-BS, identificados pelos diferentes grupos taxonômicos catalogados na SONOTECA.....	78
Tabela IV.3-1: Resumo do esforço e tamanho amostral das Campanhas de Avistagem Aérea do primeiro ano do PMC-BS.....	79
Tabela IV.4-1: Parâmetros de esforço de campo realizado nas Campanhas de Telemetria em três anos do PMC-BS.	82
Tabela IV.4-2: Espécies de cetáceos marcadas com sucesso com transmissores satelitais, usando diferentes sistemas de ancoragem, e DTAGs durante as seis Campanhas de Telemetria na Bacia de Santos. I = implantável; L = LIMPET.....	85
Tabela IV.4-3: Duração (em dias) da coleta de dados dos transmissores satelitais implantados em cetáceos de acordo com tipo de ancoragem durante as seis Campanhas de Telemetria do PMC na Bacia de Santos. .	86
Tabela IV.5-1: Dados processados por ciclo e campanha do PMC na Bacia de Santos (A – Avistagem e MAP; T – Telemetria).	86
Tabela IV.5-2: Número de registros fotográficos utilizados para cada espécie de cetáceo por campanha do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.....	88
Tabela IV.5-3: Número cumulativo de indivíduos em cada catálogo por espécie nas campanhas do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.....	90

Tabela IV.6-1: Número de amostras por espécie amostrada, após cada campanha do PMC na Bacia de Santos. A1 a A6 – Avistagem e MAP do 1º ao 6º ciclo; T1 a T6 – Telemetria do 1º ao 6º ciclo).....	94
Tabela IV.6-2: Riqueza de espécies com biópsia coletada durante as campanhas embarcadas do 1º ao 6º ciclo do PMC-BS. Em parênteses é o número de amostras.....	95
Tabela V.1-1: Espécies identificadas em três anos de atividade do PMC-BS. Status de conservação conforme a Portaria do MMA nº 444/2014 e, quando não consta na lista nacional, conforme IUCN (2018). CR = Criticamente em Perigo; EM = Em Perigo; VU = Vulnerável; QA = Quase Ameaçada; BR = Baixo Risco; DD = Deficiente em Dados.	98
Tabela V.2-1: Variáveis consideradas na modelagem de habitat.	143
Tabela V.2-2: Modelos Generalizados Lineares (GLM) considerando os efeitos de variáveis ambientais e antrópicas no número de detecções de odontocetos observados durante o PMC na Bacia de Santos.....	145
Tabela V.2-4: Informações sobre os indivíduos marcados com sucesso com transmissores satelitais nas seis Campanhas de Telemetria do PMC-BS. PTT = número de identificação do transmissor no sistema Argos; PT = total de pontos de localização recebidos; PF = total de pontos resultantes após a filtragem; DP = distância percorrida pelo indivíduo desde a data de marcação até o último ponto registrado, em km; VMD = velocidade média diária em km/dia.* Indica os indivíduos para os quais foram obtidos poucos dados, sendo excluídos das análises posteriores. Não foi possível realizar a biópsia em alguns indivíduos, o que impossibilitou a sexagem genética.....	153
Tabela V.2-5: Características dos movimentos e uso de habitat das espécies marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos, considerando os indivíduos para os quais foram obtidas informações. Média ± Desvio padrão (Mínimo – Máximo).	155
Tabela V.2-6: Espécies-alvo da telemetria satelital do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos, número de indivíduos marcados com sucesso a cada ano e características-chave das espécies.	180

Tabela V.2-7: Frequência dos haplótipos (457 pares de base) da região controle do DNAmT de <i>Tursiops truncatus</i> na Bacia de Santos (BS) e haplótipos compartilhados e privados entre os <i>T. truncatus</i> dos ecótipos costeiro e oceânico do sul do Brasil (FRUET et al., 2017) e oceânico do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (CASTILHO et al., 2015).	201
Tabela V.2-8: Frequência dos haplótipos (316 pares de base) da região controle do DNAmT de <i>Tursiops truncatus</i> na Bacia de Santos (BS) e haplótipos compartilhados e privados entre os <i>T. truncatus</i> do sul do Brasil (COSTA et al., 2017), ecótipos costeiro e oceânico (FRUET et al., 2017), e oceânico do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (CASTILHO et al., 2015). 204	204
Tabela V.2-9: Frequência dos haplótipos da região controle do DNAmT de <i>Stenella frontalis</i> na Bacia de Santos (BS). N número de indivíduos amostrados em área costeira ou oceânica.	211
Tabela V.3-1: Variáveis utilizadas para modelar a curva de detecção durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS.....	216
Tabela V.3-2: Esforço amostral e dados sobre avistagens de cetáceos observados durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS. mn = milhas náuticas; DP = desvio padrão.	217
Tabela V.3-3: Modelos de detecção para mysticetos na Bacia de Santos em função da distância das linhas de transecção, ordenados pelo menor valor de AIC (Critério de Informação de Akaike). K = número de parâmetros...218	218
Tabela V.3-6: Modelos de detecção para delfinídeos na Bacia de Santos em função da distância das linhas de transecção, ordenados pelo menor valor de AIC (Critério de Informação de Akaike). K = número de parâmetros...222	222
Tabela V.3-7: Estimativa de densidade e abundância de delfinídeos durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC - BS. Camp = campanha; N = estimativa de abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.	224
Tabela V.3-8: Estimativa de densidade e abundância do golfinho-pintado-do-Atlântico (<i>Stenella frontalis</i>) durante as campanhas de Avistagem	

Embarcada em três anos do PMC - BS. N = estimativa de abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.	225
Tabela V.3-9: Datas de início, término e esforço das campanhas executadas até o presente momento.	228
Tabela V.3-10: Número de grupos de cetáceos registrados nas seis campanhas. A coluna "Odontoceto" reúne todos os grupos de animais não identificados a nível de Família. Frequência relativa está em parênteses depois do número de registros.	229
Tabela V.3-11: Grupos de Delfinídeos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR). 229	229
Tabela V.3-12: Grupos de Odontocetos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR). 230	230
Tabela V.3-13: Grupos de Cetáceos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR). 230	230
Tabela V.3-14: Média, desvio padrão e coeficiente de variação a posteriori das taxas de perda ou probabilidade de não detecção dos animais para o primeiro observador - $g_{obs1}(0)$ - e segundo observador - $g_{obs2}(0)$ - considerando cada uma das seis campanhas.	231
Tabela V.3-15: Média, desvio padrão e coeficiente de variação para tamanho médio de grupo obtidos a partir dos dados de campo para cada uma das seis Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.	233
Tabela V.3-16: Média e desvio padrão posteriores; coeficiente de variação; quantis (0,025, 0,5 e 0,975) e DICs para a estimativa da abundância de	

Cetáceos feita pelos Modelos Logit e Probit com os dados de cada uma das seis campanhas.....	235
Tabela V.3-17: Diversidade do DNA mitocondrial das espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. n = número de amostras, Seq. (pb) = sequência em pares de bases, S = sítios polimórficos, H = haplótipos, h = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica (%).	240
Tabela V.3-18: Diversidade dos locos de microssatélites para as espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. n = número de amostras, k = número de alelos por loco.	243
Tabela V.3-19: Diversidade dos locos de microssatélites para espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. n = número de amostras, N = número de locos, A = número médio de alelos por loco, H_o = heterozigiosidade observada, H_E = heterozigiosidade esperada, $P_{(ID)}$ e $P_{(ID)sib}$ = probabilidades de identidade.	247
Tabela V.3-20: Número de machos e fêmeas identificados geneticamente para cada espécie amostrada nas campanhas de Telemetria e de Avistagem Embarcada e MAP do PMC-BS.....	253
Tabela V.3-21: Estimativa de idade das amostras de <i>Megaptera novaeangliae</i> amostradas na Bacia de Santos nas campanhas do PMC-BS, baseada nos níveis (em porcentagem) de metilação dos sítios CpG de três genes: TET2, CDKN2A e GRIA2. ID = indivíduo amostrado no grupo. * Amostra 958/12 de filhote coletada pelo Instituto Baleia Jubarte. Ad = adulto; Fe = fêmea; Fi = filhote; Ep = escorte principal; Es = escorte secundário.	258
Tabela V.4-1: Duração média, profundidade média de mergulho e desvio padrão das diferentes categorias registradas para os indivíduos marcados com transmissor satelital na Bacia de Santos e número total de mergulhos registrado para cada categoria. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos de cada parâmetro. DM = duração média em segundos; PM = profundidade média em metros. PTT = código do transmissor.	266
Tabela V.4-2: Sumário do padrão de mergulho dos dados de DTAGs dos diferentes indivíduos tagueados entre as campanhas 1 a 6 de telemetria do PMC-BS.	292

Tabela V.4-3: Sumário de detecções acústicas coletadas pelos DTAGs durante as campanhas de telemetria 1 a 6 do PMC-BS.....	294
Tabela V.4-4: Sumários das detecções acústicas de Kogia registradas no PMC-BS e número de cliques extraídos para análise.....	309
Tabela V.4-5: Resultados da análise de cliques (n= 669) de Kogia sp., incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).....	311
Tabela V.4-6: Sumários das detecções acústicas de baleia-bicuda (Ziphiidae) registradas no PMC-BS e o respectivo número de cliques extraídos para análise. 315	
Tabela V.4-7: Características observadas dos cliques dos diferentes encontros com baleias-bicudas (Família Ziphiidae) na Bacia de Santos.	317
Tabela V.4-8: Sumários das detecções acústicas de golfinho-de-Risso (Grampus griseus) registrado no PMC-BS e o número de cliques extraídos para análise.	322
Tabela V.4-9: Resultados das análises de cliques (n= 837) golfinho-de-Risso (Grampus griseus), incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).	324
Tabela V.4-10: Resultados das análises de cliques (n= 837) da orca-pigmeia (Feresa attenuata), incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).	330
Tabela V.4-11: Descrição das variáveis acústicas medidas (50) através do algoritmo ROCCA (Real-time Odontocete Call Classification Algorithm), pacote integrante do programa PAMGUARD, para os assovios de delfínídeos na Bacia de Santos.	335
Tabela V.4-12: Espécies/gêneros de delfínídeos amostradas e número de encontros com registros de assovios na Bacia de Santos, ordenada pelas espécies com maior número de amostras.	339
Tabela V.4-13: Proporção da variância explicada dos assovios de delfínídeos da Bacia de Santos pelos primeiros eixos da Análise de Componentes Principais (PCA). Variáveis mais importantes de cada eixo foram definidas	

arbitrariamente como as que possuíam autovetor maior que 0,3 ou menor que -0,3. 340

Tabela V.4-14: Classificadores dos assovios considerados para identificação da espécie de delfínídeo na Bacia de Santos. * Modelo com maior percentual de acertos em itálico.....	344
Tabela V.4-15: Matriz de confusão das classificações dos assovios pela espécie de delfínídeos da Bacia de Santos segundo o CART com variáveis identificadas pela PCA. Diagonal (em negrito) representa o número e percentual de classificações acertadas da espécie pelo modelo.	344
Tabela V.5-1: Prevalência acumulada de lesões epidérmicas (ou mutilações) entre os indivíduos identificados, por espécie e ciclo.	350
Tabela V.5-2: Ocorrência de cada tipo de lesão epidérmica por espécies (nm – nódulos multifocais; fa – ferida aberta; cel – celulite; ce – cicatriz esbranquiçada; df – deformidades físicas (malformação); pox – lesões semelhantes a poxvírus; mut – mutilações; in – inespecífica).	351

LISTA DE QUADROS

Quadro III-1: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 1 e 2 do PMC-BS.....	69
Quadro III-2: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 3 e 4 do PMC-BS.....	70
Quadro III-3: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 5 e 6 do PMC-BS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura III.1-1: Vista geral da embarcação Sea Route, utilizada para as coletas de dados embarcados nos três primeiros anos do PMC-BS.	42
Figura III.1-2: Vista geral dos botes infláveis usados nas Campanhas de Telemetria do PMC-BS. Ver texto para detalhes.	43
Figura III.1-3: Vista geral da torre de observação da embarcação Sea Route e botes infláveis transportados no convés principal.	43
Figura III.1-4: Vista geral da aeronave AeroCommander 500, utilizada nos dois primeiros anos (ciclos 1 a 4) do PMC-BS.	44
Figura III.1-5: Vista geral da aeronave Cessna 208B Grand Caravan, utilizada no último ano (ciclos 5 e 6) do PMC-BS.	45
Figura III.2-1: Detalhe da torre de observação da embarcação com observadores em esforço durante campanhas embarcadas do PMC-BS. .	46
Figura III.3-1: Recolhimento do arranjo de hidrofones a partir do guincho hidráulico. O cabo laranja enrolado no guincho é o cabo de reboque.	48
Figura III.3-2: Cabo de reboque do arranjo de hidrofones (cor laranja), lançado da popa da embarcação.	48
Figura III.3-3: Estação de MAP e operadores durante a Campanha de Avistagem Embarcada e MAP do PMC-BS.	51
Figura III.3-4: Telas dos softwares usados pelo MAP no PMC-BS: detector de clique do PAMGUARD (acima esq.), mapa para localização do PAMGUARD (abaixo esq.), software ISHMAEL (acima direita) e WHALETRAK (abaixo direita). 52	
Figura III.4-1: Observador em esforço amostral na janela bolha da aeronave AeroCommander 500, utilizada durante parte das Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.	55
Figura III.4-2: Observadores em esforço amostral na aeronave AeroCommander 500, utilizada durante parte das Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.	55
Figura III.4-3: Observador utilizando clinômetro e gravador digital para registros de avistagem durante as Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS. ...	56

Figura III.5-1: Transmissores satelitais utilizados nas Campanhas de Telemetria do PMC-BS: (A) transmissor implantável (modelo SPLASH10-260C); (B) transmissor implantável (modelo SPLASH10-302B); e (C) transmissor LIMPET (modelo SPLASH10-292A) com âncora de três (esquerda) e seis pétalas (direita).....	59
Figura III.5-2: Transmissores do tipo CATS Cam e DTAG, o primeiro utilizado apenas na Campanha 6 e o segundo nas Campanhas de 1 a 6: (A) sistema de fixação com rifle ARTS; (B) sistema de colocação com vara de fibra de carbono; (C) Transmissor do tipo CATS Cam; e (D) Transmissor do tipo DTAG do Instituto Oceanográfico de Woods Hole.....	61
Figura III.5-3: Marcação com transmissor satelital de uma orca (<i>Orcinus orca</i>) utilizando o rifle de ar comprimido durante Campanha de Telemetria do PMC-BS. 62	62
Figura III.5-4: Marcação com transmissor do tipo DTAG em uma baleia-franca-austral (<i>Eubalaena australis</i>) utilizando uma vara de fibra de carbono durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.	63
Figura III.7-1: Coleta de biópsia da proa da embarcação Sea Route durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.	66
Figura III.7-2: Triagem da amostra de biópsia coletada durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.....	67
Figura IV.1-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Avistagem Embarcada nos três primeiros anos do PMC-BS.	74
Figura IV.3-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Avistagem Aérea nos três primeiros anos do PMC-BS.....	80
Figura IV.4-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Telemetria nos três anos de PMC-BS.....	84
Figura IV.5-1: Acompanhamento cumulativo do crescimento dos catálogos para as espécies com mais indivíduos nas campanhas do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.....	91
Figura V.1-1: Número cumulativo de espécies em função dos dias amostrados nas Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanhas de Telemetria do PMC na Bacia de Santos.....	100

Figura V.1-2: Frequência de registros por espécies em Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanhas de Telemetria em três anos de PMC da Bacia de Santos.....	102
Figura V.1-3: Frequência de registros por espécie (na escala log+1) em Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos de PMC da Bacia de Santos. Abreviação das espécies na Tabela IV.1-1.	103
Figura V.1-4: Frequência de registros por espécie (na escala log+1) em Campanhas de Telemetria em três anos de PMC da Bacia de Santos. Abreviação das espécies na Tabela IV.1-1.	104
Figura V.1-5: Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G252 (identificada como G252 Peponocephala electra) e nas sequências referência da região controle do DNAmT das espécies das subfamílias Globicephalinae e Orcininae.....	112
Figura V.1-6: Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas sequências das amostras G21 (a) e G35 (b) (identificadas respectivamente como G21 Stenella longirostris e G35 Stenella attenuata) e nas sequências referência da região controle do DNAmT de todos os delfinídeos (a figura não apresenta todas as espécies).....	113
Figura V.1-7: Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G180 (a) (identificada como G180 Delphinus delphis) e nas sequências referência da região controle do DNAmT de todos os delfinídeos (a figura não apresenta todas as espécies).....	114
Figura V.1-8: Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G80 (identificada como G80 Globicephala) e nas sequências referência da região controle do DNAmT das as espécies das subfamílias Globicephalinae e Orcininae.....	115
Figura V.1-9: Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas sequências das amostras G68 (a) e G66 (b) (identificadas respectivamente como G68 e G66 B. borealis) e nas sequências referência da região controle do DNAmT de todos os misticetos (a figura não apresenta todas as espécies). Valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas. ...	115

Figura V.1-10: Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas sequências das amostras G137 (a) e G138 (b) (identificadas respectivamente como G137 e G138 <i>B. edeni</i>) e nas sequências referência da região controle do DNAm de todos os mysticetos (a figura não apresenta todas as espécies).....	116
Figura V.2-1: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos mysticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados visualmente durante as Campanhas de Avistagem Embarcada nos três anos de PMC na Bacia de Santos.....	119
Figura V.2-2: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos mysticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados acusticamente durante as Campanhas de Monitoramento Acústico Passivo (MAP) nos três anos de PMC na Bacia de Santos.	120
Figura V.2-3: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos mysticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados visualmente durante as Campanhas de Avistagem Aérea nos três anos de PMC na Bacia de Santos.....	121
Figura V.2-4: Áreas de concentração de cetáceos detectados visualmente nas Campanhas de Avistagem Embarcada nos três anos de PMC na Bacia de Santos.	123
Figura V.2-5: Áreas de concentração de cetáceos detectados acusticamente nas Campanhas de MAP nos três anos de PMC na Bacia de Santos.....	124
Figura V.2-6: Áreas de concentração de cetáceos detectados visualmente nas Campanhas de Avistagem Aérea nos três anos de PMC na Bacia de Santos.	125
Figura V.2-7: Batimetria (em metros) da Bacia de Santos.	127
Figura V.2-8: Declividade (em graus) da Bacia de Santos.....	128
Figura V.2-9: Temperatura (em graus Celsius) da Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.....	131
Figura V.2-10: Velocidade (em m/s) e direção das correntes marítimas da Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC....	132

Figura V.2-11	Clorofila a (em mg/m ³) da Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.....	134
Figura V.2-12:	Salinidade (em psu) da Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.....	135
Figura V.2-13:	Intensidade de tráfego de embarcações durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS em grid com quadrantes de 16 km. Escala de valores difere entre os mapas.....	138
Figura V.2-14:	Intensidade de atividades de pesca durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS. Escala de valores difere entre os mapas.	139
Figura V.2-15:	Intensidade de ruídos nas faixas de frequência de 63 e 125 Hz a 100 metros de profundidade na Bacia de Santos entre 2015 e 2017.....	140
Figura V.2-16:	Correlação entre as variáveis explanatórias consideradas na modelagem de uso de habitat.....	144
Figura V.2-17:	Previsões do melhor GLM para o número de detecções de odontocetos em quadrantes na Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.....	146
Tabela V.2-3:	Modelos Generalizados Lineares (GLM) considerando os efeitos de variáveis ambientais e antrópicas no número de detecções de mysticetos observados durante o PMC na Baía de Santos.....	147
Figura V.2-18:	Previsões do melhor GLM para o número de detecções de mysticetos em quadrantes na Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.....	148
Figura V.2-19:	Movimentação dos golfinhos-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	157
Figura V.2-20:	Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) dos golfinhos-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.....	158
Figura V.2-21:	Movimentação das baleias-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	162

Figura V.2-22: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) das baleias-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos.....	163
Figura V.2-23: Movimentação das orcas (<i>Orcinus orca</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	165
Figura V.2-24: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) dos indivíduos de <i>Orcinus orca</i> marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.	165
Figura V.2-25: Movimentação das três baleias-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	167
Figura V.2-26: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) das três baleias-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	168
Figura V.2-27: Movimentação dos golfinhos-cabeça-de-melão (<i>Peponocephala electra</i>) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.....	170
Figura V.2-28: Movimentação dos cachalotes (<i>Physeter macrocephalus</i>) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	172
Figura V.2-29: Movimentação das duas baleias-de-Bryde (<i>Balaenoptera brydei</i>) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.	174
Figura V.2-30: Movimentação da baleia-minke-Antártica (<i>Balaenoptera bonaerensis</i>) marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos ao longo de três anos.	176
Figura V.2-31: Mapa com as localizações de reavistagens de <i>Tursiops truncatus</i> .	184
Figura V.2-32: Mapa com as localizações de reavistagens de <i>Steno bredanensis</i>	186
Figura V.2-33: Mapa com as localizações de uma reavistagem de <i>Sotalia guianensis</i> .	188

Figura V.2-34: Mapa com as localizações de reavistagens de <i>Balaenoptera brydei</i> . 190	190
Figura V.2-35: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de <i>Balaenoptera physalus</i> 192	192
Figura V.2-36: Mapa com as localizações do indivíduo de <i>Stenella frontalis</i> reavistado. 193	193
Figura V.2-37: Mapa com as localizações do grupo de <i>Peponocephala electra</i> reavistado. 194	194
Figura V.2-38: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de <i>Balaenoptera borealis</i> 196	196
Figura V.2-39: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de <i>Megaptera novaeangliae</i> 198	198
Figura V.2-40: Locais de coleta de biópsia dos indivíduos de <i>Tursiops truncatus</i> na Bacia de Santos durante o PMC-BS. 200	200
Figura V.2-41: ΔK calculado usando STRUCTURE HARVESTER para agrupamentos de 1 a 4 dos <i>Tursiops truncatus</i> da Bacia de Santos; a) sem informação sobre o local de amostragem, b) com informação sobre o local de amostragem. 207	207
Figura V.2-42: Gráfico do STRUCTURE com a proporção de associação de cada indivíduo de <i>Tursiops truncatus</i> a cada agrupamento para $K = 2$ a $K = 4$ com o local de amostragem na Bacia de Santos informado (costeiro x oceânico). Cada indivíduo é representado por uma barra vertical dividida em segmentos coloridos com o comprimento indicando o coeficiente de associação a cada agrupamento. 208	208
Figura V.2-43: Locais de coleta de biópsias dos indivíduos de <i>Stenella frontalis</i> na Bacia de Santos durante o PMC. 210	210
Figura V.2-44: ΔK calculado usando STRUCTURE HARVESTER para agrupamentos de 1 a 4 dos <i>Stenella frontalis</i> da Bacia de Santos. 212	212
Figura V.2-45: Gráfico do STRUCTURE com a proporção de associação de cada indivíduo de <i>Stenella frontalis</i> a cada agrupamento para $K = 2$ a $K = 4$ com o local de amostragem na Bacia de Santos informado (costeiro x oceânico). Cada indivíduo é representado por uma barra vertical dividida em	

segmentos coloridos com o comprimento indicando o coeficiente de associação a cada agrupamento.....	213
Figura V.3-1: Curva de detecção (linha vermelha) meia-normal de um modelo ajustado aos dados de mysticetos observados durante as Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.	219
Tabela V.3-4: Estimativa de densidade e abundância de mysticetos durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS. N = abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação. .	220
Figura V.3-2: Abundância de mysticetos observados ao longo das Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.	221
Figura V.3-3: Curva de detecção (linha vermelha) meia-normal de um modelo ajustado aos dados de delphinídeos observados durante as Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.	223
Figura V.3-4: Abundância de delphinídeos observados ao longo das quatro Campanhas de Avistagem Embarcada dos primeiros anos do PMC-BS.	224
Figura V.3-5: Curva de detecção dos Modelos Logit e Probit para a 6ª Campanha de Avistagem Aérea. Curvas representam a probabilidade de detecção do primeiro observador (linhas sólidas) e do segundo observador (linhas tracejadas). As linhas tracejadas verticais representam o retículo 50.	232
Figura V.3-6: Histograma da distribuição posterior da estimativa de abundância de cetáceos para os dados das seis campanhas. As linhas verticais sólidas e tracejadas representam, respectivamente, as médias e o intervalo de credibilidade de 95%, obtidas pelo modelo Logit.....	233
Figura V.3-7: Histograma da distribuição posterior da estimativa de abundância de cetáceos para os dados das seis campanhas. As linhas verticais sólidas e tracejadas representam, respectivamente, as médias e o intervalo de credibilidade de 95%, obtidas pelo modelo Probit.	234
Figura V.3-8: Regressão linear múltipla das idades estimadas de 45 Megaptera novaeangliae baseada nas medidas de metilação dos sítios CpG e idade conhecida. Dados de Polanowski et al. (2014).	258

Figura V.4-1: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para os golfinhos-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>) marcados com transmissores satelitais números PTT 158544, 158551, 162632 e 162634 (A); e 162637, 166663 e 34751 (B) marcados na Bacia de Santos.....	263
Figura V.4-2: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de golfinhos-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i> , marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.	264
Figura V.4-3: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de golfinhos-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i> , marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.	264
Figura V.4-4: Frequência dos comportamentos de mergulhos registrados em baleias-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i>), marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.....	270
Figura V.4-5: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i> , marcadas com transmissores satelitais na região costeira da Bacia de Santos.	271
Figura V.4-6: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i> , marcadas com transmissores satelitais na região costeira da Bacia de Santos.	271
Figura V.4-7: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	272
Figura V.4-8: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	272
Figura V.4-9: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as orcas (<i>Orcinus orca</i>) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.	274
Figura V.4-10: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de orca, <i>Orcinus orca</i> , marcada com transmissor satelital na região costeira da Bacia de Santos.	274

Figura V.4-11: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de orca, <i>Orcinus orca</i> , marcada com transmissor satelital na região costeira da Bacia de Santos.	275
Figura V.4-12: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de orcas, <i>Orcinus orca</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	275
Figura V.4-13: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de orcas, <i>Orcinus orca</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	276
Figura V.4-14: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as baleias-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.....	278
Figura V.4-15: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-sei, <i>Balaenoptera borealis</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	279
Figura V.4-16: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-sei, <i>Balaenoptera borealis</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	279
Figura V.4-17: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para os cachalotes (<i>Physeter macrocephalus</i>) marcados com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.....	281
Figura V.4-18: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de cachalotes, <i>Physeter macrocephalus</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	282
Figura V.4-19: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de cachalotes, <i>Physeter macrocephalus</i> , marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.	282
Figura V.4-20: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as baleias-de-Bryde (<i>Balaenoptera brydei</i>) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.	284

Figura V.4-21: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-de-Bryde, <i>Balaenoptera brydei</i> , marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos.	285
Figura V.4-22: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-de-Bryde, <i>Balaenoptera brydei</i> , marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos.	285
Figura V.4-23: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para a baleia-minke-Antártica (<i>Balaenoptera bonaerensis</i>) marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.	287
Figura V.4-24: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho da baleia-minke-Antártica, <i>Balaenoptera bonaerensis</i> , marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.	288
Figura V.4-25: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho da baleia-minke-Antártica, <i>Balaenoptera bonaerensis</i> , marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.	288
Figura V.4-26: Mapa indicando a espécie e os locais de colocação dos DTAGs (n = 12). Campanhas 1 a 6 de telemetria do PMC-BS. Espécies: bb (<i>Balaenoptera borealis</i>), be (<i>Balaenoptera brydei</i>), bp (<i>Balaenoptera physalus</i>), ea (<i>Eubalaena australis</i>), Mn (<i>Megaptera novaeangliae</i>), pm (<i>Physeter macrocephalus</i>), pe (<i>Peponocephala electra</i>).	290
Figura V.4-27: Perfis de mergulho sincronizados entre fêmea e filhote de <i>M. novaeangliae</i> (DTAGs mn17_316a and mn17_316b) tagueados com DTAGs nas campanhas do PMC-BS.	293
Figura V.4-28: Sequência densa e sobreposta de cliques usuais de <i>P. macrocephalus</i> detectados no DTAG pm17_324a em campanhas do PMC-BS.	298
Figura V.4-29: Vocalizações detectadas no DTAG da baleia-franca (ea17_221a): “Sirene com variante ascendente” (vermelho), “Sirene” (laranja) e “Chirps” (amarelo).	300
Figura V.4-30: Vocalizações detectadas no DTAG da baleia-jubarte (mn17_316a): “Chamado de sirene com variante ascendente” (vermelho) e “Chirps” (amarelo).....	301

Figura V.4-31: Exemplos de prováveis codas de <i>P. macrocephalus</i> detectados no DTAG pm17_324a.....	304
Figura V.4-32: Exemplo de uma sequência de cliques de um odontocetos registrado no PMC-BS.....	305
Figura V.4-33: Interface Gráfica do programa analisador de cliques desenvolvido pelo PMC-BS para visualização, seleção e análise de cliques de odontocetos.....	307
Figura V.4-34: Forma da onda de um clique de <i>Kogia</i> sp. O pulso apresenta inúmeras oscilações com decaimento gradual de energia e uma cauda alongada. 310	310
Figura V.4-35: Espectro de frequência de um clique de <i>Kogia</i> . Os cliques apresentam uma banda estreita e um único pico em cerca de 125 - 130 kHz. 310	310
Figura V.4-36: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique de <i>Kogia</i> . O clique apresenta pico de frequência alto, banda estreita e duração em cerca de 200 μ . 311	311
Figura V.4-37: À direita: representação da forma da onda de um clique de baleia-bicuda, mostrando o formato em “bolha” do clique. À esquerda: o gráfico de Wigner-Ville mostrando a modulação de frequência característica do clique (energia se distribui na diagonal).	315
Figura V.4-38: Espectro de frequência dos cliques dos quatro encontros acústicos de zifídeos analisados no PMC-BS.	318
Figura V.4-39: Exemplos de cliques do golfinho-de-Risso (<i>Grampus griseus</i>). Os exemplos ilustram cliques com diferentes graus de distorção, provavelmente relacionados ao fato de terem sido captados de diferentes ângulos (desconhecidos) em relação ao animal emissor.....	323
Figura V.4-40: Espectro de frequência de quatro cliques do golfinho-de-Risso (<i>Grampus griseus</i>). A figura superior à direita representa um clique de duração mais curta (> 100 μ s), banda mais larga e frequência pico típica (em torno de 50 kHz). Os outros cliques são de duração maior e os picos e vales são mais pronunciados. A figura inferior à esquerda mostra um clique com	

- frequência pico mais alta do que a média (em torno de 70 kHz) e um pico secundário em 50 kHz.325
- Figura V.4-41: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique do golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*). Neste exemplo, um clique típico dentre as características observadas neste estudo.....325
- Figura V.4-42: Exemplos de cliques da orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). Os exemplos ilustram cliques com diferentes graus de distorção, provavelmente relacionados ao fato de terem sido captados de diferentes ângulos (desconhecidos) em relação ao animal emissor.....329
- Figura V.4-43: Espectro de frequência de quatro cliques de orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). O pico de frequência máximo e os picos secundários variaram entre 50 - 90 kHz. Picos menores foram observados em cerca de 110 kHz para alguns cliques, como no da figura inferior à direita.....330
- Figura V.4-44: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique da orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). Neste exemplo, há um clique típico dentre as características observadas neste estudo. O pico de frequência em cerca de 60 kHz (cor vermelha), a banda larga (-10dB em 47 kHz) e duração curta (40 μ s). 331
- Figura V.4-45: Biplot com os dois primeiros eixos fatoriais da Análise de Componentes Principais (PCA) das características dos assovios de diferentes gêneros de delfinídeos da Bacia de Santos. Elipses normais para cada grupo com 95% de probabilidade.341
- Figura V.4-46: Matriz de correlação das variáveis descritivas dos assovios de delfinídeos da Bacia de Santos pelo ROCCA. Ver abreviações e descrição das variáveis na Tabela V.4-11.342
- Figura V.4-47: Árvore de Classificação (CART) dos assovios de delfinídeos na Bacia de Santos, segundo o modelo com variáveis similares à literatura. Números fracionados ao lado da variável acústica (ex: $FREQMAX > -2$) representam características que direcionam a espécie para ramos de classificação distintos, configurando-a; números dentro dos retângulos e abaixo do nome de gênero/espécie (ex: *Tursiops* 33/48): o número esquerdo representa o valor previsto (média de todos os subramos) enquanto o

número direito seria a porcentagem deste resultado de decisões do valor utilizado na amostra.....	345
Figura V.5-1: Lesão de interação antrópica em <i>Balaenoptera brydei</i> : provável mutilação por colisão com embarcação. Avistado no dia 18/02/2017 às 15:43 hrs (-23,84662°; -45,22770°) .	354
Figura V.5-2: Lesão em <i>Tursiops truncatus</i> : provável mutilação por interação com pesca. Avistado no dia 20/07/2017 às 07:34 hrs (-22,81966°; -41,83288°).	355
Figura V.5-3: Lesão em <i>Tursiops truncatus</i> : mutilação na nadadeira dorsal. Avistado no dia 25/02/2016 às 13:25 hrs (-25,48014°; -48,10401°) .	355
Figura V.5-4: Lesão em <i>Balaenoptera brydei</i> : lesão focal, discreta em superfície epidérmica de coloração esbranquiçada, focalmente expansiva com bordos irregulares, com provável reação inflamatória ao redor (etiologia desconhecida). Avistado no dia 02/03/2016 às 08:48 hrs (-23,27397°; -44,31604°).	356
Figura V.5-5: Lesão em <i>Balaenoptera physalus</i> : lesão bem delimitada, com os bordos escurecidos, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 06/07/2017 às 12:50 hrs (-27,85924°; -47,10048°).	357
Figura V.5-6: Lesão em <i>Balaenoptera brydei</i> : lesão bem delimitada, com os bordos esbranquiçados, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 13/07/2017 às 08:55 hrs (-26,26151°; -45,95052°).	357
Figura V.5-7: Lesão em <i>Balaenoptera borealis</i> : lesão bem delimitada, com os bordos esbranquiçados, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 01/09/2016 às 14:31 hrs (-26,07750°; -45,58635°).	358
Figura V.5-8: Lesão em <i>Grampus griseus</i> : lesões nodulares, multifocais discretas, semelhantes a poxvírus. Avistado no dia 05/04/2018 às 14:48 hrs (-24,39647°; -42,52979°) .	358
Figura V.5-9: Lesão em <i>Peponocephala electra</i> : lesões nodulares, multifocais discretas, semelhantes a poxvírus. Avistado no dia 06/04/2018 às 07:50 hrs (-24,29931°; -42,39903°) .	359

- Figura V.5-10: Lesão em *Stenella clymene*: lesão bem delimitada, com centro escurecido, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 08/07/2017 às 09:28 hrs (-27,34885°; -46,41224°).....359
- Figura V.5-11: Lesão em *Balaenoptera borealis*: possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 21/07/2017 às 16:12 hrs (-23,92087°; -42,20885°).
360
- Figura V.5-12: Lesão em *Balaenoptera musculus*: ferida aberta multifocal, possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 22/07/2017 às 10:07 hrs (-24,19142°; -42,41624°).360
- Figura V.5-13: Lesão em *Stenella attenuata*: ferida aberta, possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 05/04/2018 às 09:48 hrs (-24,39647°; -42,52979°).....361
- Figura V.5-14: Lesão em *Delphinus delphis*: material não identificado (possível craca peduncular) aderido ao rosto, aparentemente acometendo mandíbula e maxila. Avistado no dia 28/02/2016 às 10:55 hrs (-23,97636°; -45,54699°).
361
- Figura V.5-15: Provável deformação congênita em rosto de *Stenella frontalis*. Avistado no dia 25/07/2017 às 08:38 hrs (-23,47333°; -44,85064°).362
- Figura V.5-16: Lesão em *Stenella frontalis*: lesão nodular, focal, circunscrita, bem delimitada em região de maxila direita (etiologia desconhecida). Avistado no dia 26/02/2016 às 13:56 hrs (-24,81083°; -47,24952°).362
- Figura V.5-17: Lesão em *Balaenoptera borealis*: deformidade na nadadeira dorsal. Avistado no dia 25/08/2016 às 06:44 hrs (-23,64270°; -42,08423°).363
- Figura V.5-18: Lesão em *Balaenoptera brydei*: lesão bem delimitada, com o centro deprimido, discreto-moderada, multifocal (etiologia desconhecida). Avistado no dia 04/02/2017 às 10:54 hrs (-25,92682°; -45,74579°).....363
- Figura V.5-19: Lesão em *Stenella frontalis*: lesão nodular (etiologia desconhecida). Avistado no dia 05/02/2017 às 07:35 hrs (-25,86653°; -45,66082°).....364
- Figura V.5-20: Lesão esbranquiçada de etiologia desconhecida em *Stenella frontalis*: aparente cicatrização. Avistado no dia 06/02/2017 às 10:14 hrs (-25,72212°; -45,34461°).....364

Figura V.5-21: Lesão em Balaenoptera bonaerensis: nódulos multifocais. Avistado no dia 23/07/2017 às 16:29 hrs (-23,99304°; -43,11423°).....	365
Figura 5.2.2-1: Box-plot representando a mediana, máximos e mínimos das concentrações dos compostos mais relevantes encontrados nas amostras elencadas na Figura 6 (BGC: 123, 125, 128, 143, 173, 175, 176, 188, 193, 208, 209, 215, 216, 217).....	373

LISTA DE ANEXOS

Anexo IV.1.2-1: Resultados da identificação genética das amostras por DNAm e sexagem molecular. * Espécies identificadas em campo que não foram corroboradas pelos resultados genéticos. N/A = not available. Identificação dos haplótipos: HT = Tursiops truncatus, HSO = Sotalia guianensis, HDD = Delphinus delphis, HSB = Steno bredanensis, HSF = Stenella frontalis, HSL = S. longirostris, HSA = S. attenuata, HSC = S. clymene, HGM = Globicephala macrorhynchus, HO = Orcinus orca, HPE = Peponocephala electra, HPM = Physeter macrocephalus, HBE = Balaenoptera brydei, HBB = B. bonaerensis, HBM = B. musculus, HBP = B. physalus, HBb = B. borealis, HBA e HGA = M. novaeangliae, HEA = Eubalaena australis.429

Anexo II.5.2-I: Relatório Executivo - Considerações sobre os Primeiros Resultados de Análises Químicas de Contaminantes (HPA) e Bio Contaminantes em Cetáceos, Obtidos no Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS443

APRESENTAÇÃO

O Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS objetiva atender demanda do Processo de Licenciamento Ambiental - IBAMA Nº 02001.114289/2017-80 - conduzido pela Coordenação Geral de Licenciamento Ambiental de Empreendimentos Marinhos e Costeiros – CGMac, da Diretoria de Licenciamento Ambiental – DILIC, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

O volume I, do 3º Relatório Anual do PMC-BS, apresenta a consolidação do processamento dos dados e análises dos três primeiros anos de execução do PMC-BS, conforme previsto em seu Projeto Executivo, aprovado pelo IBAMA em julho de 2015, constituindo uma atualização baseada na acumulação de dados gerados com a execução do projeto, juntamente com aqueles apresentados nos 1º e 2º Relatórios Anuais, e o aprofundamento das análises. É fruto da execução do projeto nesse período pela equipe da Socioambiental Consultores Associados, sob a supervisão da equipe da Petrobras - SMS Meio Ambiente da Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos, mediante contrato nº 2400.0097391.15.2 entre esta empresa e a Petrobras.

Este 3º Relatório Anual focou na consolidação de informações sobre as espécies registradas, buscando o aprofundamento das diversas análises com base nos novos dados e no cruzamento de novas informações sobre atividades antropogênicas com a distribuição e a presença de cetáceos. São apresentadas também algumas considerações críticas a respeito da aplicação dos métodos utilizados e dos objetivos do projeto.

O 3º Relatório Anual do PMC-BS foi elaborado em dois volumes: Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos; Volume II: Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos.

EQUIPE TÉCNICA EXECUTORA DO PMC-BS

Nomes	Formação	Atuação
Coordenação e Gerência		
Ricardo Müller Arcari	Engº. Sanitarista e Ambiental	Gerente do Contrato
José Olimpio da Silva Jr.	Biólogo, Me. em Geografia	Coordenação Geral e Integração Temática
Leonardo Liberali Wedekin	Biólogo, Dr.	Coord. Técnica e Coord. Avistagem Embarcada
Aline Fernandes de Faria Gonçalves	Biólogo, Esp. Gestão Ambiental	Gerência Executiva
Ana Lúcia Cypriano de Souza	Bióloga, Dra.	Coordenação Temática de Genética
Fernando Roberto G. Silveira	Biólogo, Dr.	Coord. Temática de Avistagem Aérea
Marcos R. Rossi dos Santos	Biólogo, Dr.	Coord. Temática de Bioacústica
Marta Jussara Cremer	Bióloga, Dra.	Coord. Temática de Telemetria
Outros Responsáveis Técnicos		
Alexandre Douglas Paro	Biólogo, Me.	Processamento e Análise de MAP
Angela de Lucca R. Wagener	Química, Dra.	Discussão Análises Químicas e Biomarcadores
David Haas	Engenheiro, PhD student	Processamento Análise dos dados dos DTAGs
Fábio Daura-Jorge	Biólogo, Dr.	Foto-identificação
Vitor Zimmermann	Geógrafo	Sist. Gerenc. Dados e Geoprocessamento/SIG

I. INTRODUÇÃO

O Terceiro Relatório Anual do PMC-BS traz a consolidação dos dados primários gerados nos três primeiros anos do projeto, quando foram realizadas as 18 campanhas de campo executadas em seis ciclos semestrais para a aplicação dos diversos métodos previstos para atender aos objetivos do projeto.

Com base nos dados gerados nesses três anos de atividades, este relatório focou na consolidação e na discussão das informações relativas à biologia das espécies registradas (riqueza, distribuição, densidade, abundância, usos de habitats e alguns padrões de comportamento), além do aprofundamento da avaliação de aspectos antrópicos.

O estabelecimento do foco dos relatórios seguiu uma lógica de acúmulo crescente de dados, a possibilidade de uma abordagem sazonal e de comparação de dados de uma série temporal mínima. Também foi considerada a oportunidade de cruzamento dos dados do PMC-BS com outras bases de dados, sejam estes de aspectos naturais ou antropogênicos, disponíveis ou que estejam sendo gerados paralelamente à execução do PMC-BS, como os dados dos outros programas de monitoramento ambiental desenvolvidos pela Petrobras na Bacia de Santos.

Seguindo a definição de abrangência dos relatórios, buscou-se neste terceiro relatório anual a consolidação de alguns aspectos da biologia (p.ex., uso de habitat, distribuição, tamanho e composição do grupo), e o aprofundamento das abordagens dos relatórios anteriores, incluindo dos cruzamentos com dados de outros projetos de monitoramento na Bacia de Santos. Neste sentido, este relatório - além de inserir dados atualizados do Projeto de Monitoramento do Tráfego de Embarcações – PMTE, dos dados físico-químicos e biológicos disponíveis em base de dados oceanográficos (como diferentes bases *online* da NOAA – *National Oceanic and Atmospheric Administration*) e da localização das unidades de produção da Petrobras, já abordados no relatório anterior - realizou também cruzamentos com dados do Programa de Monitoramento da Paisagem Acústica Submarina – PMPAS, além de informações extraídas do Sistema de Informações Georreferenciadas (SIG) do PMC relativas a atividades de pesca.

Com isto, sem que se tenha esgotado as possibilidades de análises, seja nesta etapa de execução do projeto e, sobretudo, com sua evolução nos próximos anos, considera-se que os objetivos do PMC-BS, definidos em seu Projeto Executivo foram todos abordados neste Terceiro Relatório Anual.

O presente relatório traz inicialmente um breve resumo executivo com a síntese dos resultados obtidos pelo projeto nos três primeiros anos. Em seguida é realizada uma breve descrição dos métodos de coleta utilizados, ressaltando que estes métodos de coleta e de processamento de dados foram aprofundados e descritos detalhadamente em pelo menos oito procedimentos operacionais. Estes procedimentos operacionais foram elaborados no primeiro ano do PMC-BS e aprimorados continuamente ao longo dos três anos. Em seguida é descrito o esforço amostral empregado e amostras disponíveis para as análises (número de detecções acústicas e visuais, número de biópsias efetuadas, número de indivíduos identificados por fotografias e número de indivíduos marcados com transmissores digitais). O item seguinte é o principal deste relatório, com os resultados provenientes de diferentes métodos e combinações destes orientados para os objetivos do projeto. Finalmente, trazemos uma reflexão crítica sobre cada objetivo específico do projeto e avanços em relação ao relatório anual anterior num item de considerações finais.

II. RESUMO EXECUTIVO

Seguem abaixo os principais resultados obtidos ao final de três anos do PMC-BS e apresentados no presente relatório:

- Em três anos de projeto, o PMC-BS realizou um esforço amostral de pesquisa sobre cetáceos inédito na costa brasileira, com um total de 469 dias de amostragem e mais de 87.000 km percorridos por avião ou barco;
- O projeto se destaca pela ampla diversidade de técnicas utilizadas, com vasto uso de tecnologia, as quais se complementam nas informações obtidas, resultando em dados de excelente qualidade;
- Com esses dados, foi possível descrever a comunidade de cetáceos de forma adequada, sendo registradas 25 espécies e sete famílias, correspondendo a 66% da riqueza de espécies esperada para a Bacia de Santos;
- A identificação molecular permitiu elucidar a identificação de quatro espécies de cetáceos de difícil reconhecimento visual (p.ex., gêneros *Delphinus* e *Globicephala*) e/ou com taxonomia complexa (p.ex., *Balaenoptera brydei*), tanto no nível específico quanto no subespecífico, além de aprimorar a informação advinda da identificação visual em campo;
- Aproximadamente um terço das espécies registradas está classificado com algum grau de ameaça de extinção. Outros 36% das espécies são classificados como “Deficiente em Dados”, significando que existem ameaças reais, mas não existem dados que permitam acessar seu *status*;
- As espécies se distribuíram de forma heterogênea na Bacia de Santos, com a existência de áreas de concentração (alta densidade) de avistagens/detecções;
- Dentre as regiões de maior ocorrência, destacam-se vários setores do talude continental (região de grande declividade que vai de 200 a 2.000 metros de profundidade) e a região norte da área de estudo, adjacente a Cabo Frio, tanto em águas costeiras quanto mais afastadas da costa;
- Outras regiões costeiras e oceânicas podem concentrar cetáceos de forma temporária, com variações entre campanhas. Estas concentrações

efêmeras em certas áreas, com alta densidade de grupos de cetáceos provavelmente têm relação com características oceanográficas dinâmicas, como a sazonalidade marcante da área de estudo e a ocorrência de fenômenos relacionados a giros e à ressurgência de águas frias e produtivas, ocasionando aumento da produtividade biológica;

- Os modelos de habitat reforçam a importância de variáveis ambientais como a profundidade em determinar a distribuição de cetáceos. A modelagem também aponta para a correlação da distribuição de cetáceos com variáveis antrópicas, entretanto, sem evidências conclusivas de alguma interferência negativa de atividades antrópicas no uso espacial dos cetáceos;
- A obtenção de dados inéditos com transmissores satelitais para oito espécies de cetáceos na Bacia de Santos, com 28 indivíduos marcados com sucesso, merece ser ressaltada;
- A Bacia de Santos está inserida na rota migratória de pelo menos três espécies de mysticetos: *Megaptera novaeangliae*, *Balaenoptera bonaerensis* e *Balaenoptera borealis*;
- Além das espécies migratórias, foram descritos movimentos de duas espécies na região (*Tursiops truncatus* e *Balaenoptera brydei*) assim como deslocamentos de grande extensão para fora da Bacia de Santos, em direção ao sul, para *Physeter macrocephalus* e *Orcinus orca*;
- As análises de estrutura genética populacional de *Tursiops truncatus* e *Stenella frontalis* da Bacia de Santos sugerem que ambas as populações são panmíticas (acasalamento aleatório), com altos níveis de diversidade genética;
- Alta diversidade genética foi encontrada nas quatro espécies de odontocetos com maior amostragem (*Tursiops truncatus*, *Stenella frontalis*, *S. longirostris* e *S. attenuata*), e nas baleias *Megaptera novaeangliae* e *Balaenoptera borealis*, enquanto *B. brydei* apresentou uma diversidade genética muito baixa;
- A densidade e abundância de mysticetos e delfínidos variaram substancialmente entre as campanhas. A abundância de mysticetos oscilou

de 170 a pouco menos de 3.000 indivíduos na Bacia de Santos. Foi possível estimar ainda uma abundância média de 842 indivíduos para a baleia-jubarte;

- Os delfínídeos foram o grupo mais abundante de cetáceos registrados pelo PMC-BS, com estimativas variando entre 26 e 45 mil indivíduos na Bacia de Santos. *Stenella frontalis* apresentou uma abundância média de pouco menos que 20.000 indivíduos;
- *Stenella longirostris* foi a única espécie que mostrou uma proporção sexual significativamente diferente da esperada de 1:1, com uma proporção maior de fêmeas;
- Descreveu-se o comportamento de mergulho de quatro espécies de mysticeto (*Megaptera novaeangliae*, *Balaenoptera borealis*, *B. bonaerensis* e *B. physalus*) e três espécies de odontoceto (*Physeter macrocephalus*, *Orcinus orca* e *Tursiops truncatus*) por meio de transmissores satelitais, assim como os padrões de uso da coluna d'água;
- O monitoramento acústico passivo obteve êxito na detecção de cetáceos, principalmente na detecção de assovios e cliques dos odontocetos. No geral, o MAP foi mais eficiente que a avistagem na detecção dos odontocetos;
- Espécies de difícil detecção e muito pouco conhecidas puderam ser registradas pelo MAP, mostrando que se trata de uma técnica complementar importante aos métodos visuais;
- A Sonoteca está constituída de milhares de amostras de vocalizações de 15 grupos taxonômicos diferentes;
- Os esforços de caracterização e comparação das vocalizações dessas espécies indicam características espécie-específicas nas vocalizações, contribuindo para o incremento das detecções e qualidade das informações obtidas sobre diversas espécies de cetáceos;
- O desenvolvimento de classificadores de assovios com boa taxa de acerto de identificação e que futuramente serão utilizados para identificação taxonômica dos sinais acústicos detectados também merece destaque;

- Ao longo dos três anos do PMC-BS, foi possível catalogar por foto-identificação 885 indivíduos, iniciando a elaboração de catálogos de referência para 24 espécies. Para oito espécies, mais de 25 indivíduos foram catalogados, ressaltando-se as espécies *Tursiops truncatus*, *Stenella longirostris* e *S. frontalis*, com mais de 100 indivíduos catalogados para cada uma;
- Um total de 25 indivíduos de nove espécies diferentes, catalogados e reamostrados, permitiu a discussão de padrões de movimento em pequena e larga escala, bem como de padrões de fidelidade e residência a áreas costeiras;
- Por meio de comparação de catálogos de foto-identificação com outros grupos de pesquisa, foi possível identificar um deslocamento linear de 3.500 km de um indivíduo de *Balaenoptera borealis* e um deslocamento linear de 500 km de um indivíduo de *Megaptera novaeangliae*;
- A ocorrência e a prevalência de lesões epidérmicas foram avaliadas por espécie e tipo de lesão, incluindo 13 registros de mutilações antrópicas em oito espécies diferentes, com destaque para a alta prevalência de lesões em *Balaenoptera brydei* e registros semelhantes a poxvírus em 6 espécies diferentes;
- Foi apresentada uma primeira análise dos resultados dos estudos de ocorrência de compostos orgânicos, HPA e biomarcadores em cetáceos da Bacia de Santos. As concentrações de HPA nas 69 amostras avaliadas são menores ou da mesma ordem de grandeza daquelas reportadas na literatura.

III. MÉTODOS

As grandes plataformas de coleta de dados utilizadas para atender aos objetivos do PMC-BS, conforme previsto no Projeto Executivo, resumidamente consistem de campanhas de Avistagem Embarcada e Monitoramento Acústico Passivo (MAP), campanhas focadas na Telemetria e campanhas de Avistagem Aérea. Durante as campanhas embarcadas (Avistagem/MAP e Telemetria), foram usados meios para obtenção de biópsia (pele e gordura) e fotografias que permitiam a identificação individual dos cetáceos. Este relatório aborda os dados coletados nos primeiros três anos do projeto até o momento, totalizando 18 campanhas de campo. Abaixo são descritas as principais linhas de atuação na coleta de dados do PMC:

- **Campanhas de Avistagem Embarcada e MAP**

Realizadas em caráter semestral, as campanhas de Avistagem Embarcada e MAP são executadas em cerca de 41 dias cada uma. Os três primeiros anos englobaram a realização de um total de seis campanhas embarcadas usando o método de transecções lineares com amostragem de distâncias (*Distance Sampling*). As linhas de transecção foram posicionadas sistematicamente na Bacia de Santos e abrangeram tanto águas profundas quanto rasas. Os registros visuais e acústicos possibilitaram a busca de dados sobre ocorrência, riqueza, densidade, abundância e distribuição das espécies.

- **Campanhas de Avistagem Aérea**

Foram realizados sobrevoos semestralmente, executados geralmente em até dez dias de mobilização. Eles permitiram que toda a Bacia de Santos fosse amostrada em um período curto de tempo. As seis campanhas aéreas realizadas nos três primeiros anos do PMC contaram com a utilização do método de transecções lineares com amostragem de distâncias (*Distance Sampling*), sistematicamente distribuídas na Bacia de Santos. Amostraram-se tanto águas profundas quanto rasas, buscando a obtenção de dados sobre ocorrência, riqueza, densidade, abundância e distribuição das espécies.

- **Campanhas de Telemetria**

As campanhas de Telemetria foram realizadas semestralmente para a implantação de transmissores satelitais ou arquivais com sistema de rastreamento VHF visando obter dados de deslocamento, padrões comportamentais e de uso de habitat dos cetáceos de maior tamanho. Essas campanhas tiveram duração de 25 dias cada, com exceção da última campanha (Campanha 4 de Telemetria), que teve duração de 37 dias. Durante as seis campanhas de telemetria realizadas nos três primeiros anos do projeto percorreram-se rotas concentrando o esforço em regiões de maior densidade de cetáceos, como águas mais rasas (até 50 metros) e mais profundas, na região do talude continental (200 a 1.500 metros). A amostragem nessas campanhas foi mais flexível, de maneira ajustável às condições do mar e à ocorrência de oportunidades de encontro de cetáceos passíveis de marcação, com vistas a aumentar a probabilidade de colocação de transmissores.

- **Fotoidentificação**

Os registros de fotoidentificação foram obtidos primariamente durante as Campanhas de Telemetria e oportunisticamente nas Campanhas de Avistagem Embarcada e MAP. Os registros fotográficos e o uso das marcas naturais observadas em diversos cetáceos permitiram realizar a identificação individual dos espécimes avistados para a análise de padrões de fidelidade e residência a determinadas áreas e movimentos individuais em diferentes escalas, assim como o registro de patologias de pele que contribuíssem para a análise do estado de saúde dos indivíduos.

- **Biópsias para Análises Genéticas, de Biomarcadores e de Contaminantes**

A coleta de biópsias de tecido (pele e gordura) de cetáceos foi realizada prioritariamente nas Campanhas de Telemetria e oportunisticamente nas Campanhas de Avistagem Embarcada e MAP. As amostras foram obtidas por meio de coleta remota com balestra (besta) e flechas com ponteiras adaptadas

para retirar um pedaço de pele e gordura. As frações de amostras foram devidamente acondicionadas em nitrogênio líquido, geladeira e/ou álcool para envio a diversos laboratórios de análise. As amostras para análise de biomarcadores foram remetidas ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC). As amostras de contaminantes foram remetidas ao Departamento de Oceanografia Física, Química e Geológica do Instituto Oceanográfico, da Universidade de São Paulo (IO-USP). Por último, as análises genéticas foram executadas pelo Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), em Porto Alegre.

Os itens seguintes trazem uma descrição sucinta das plataformas e dos métodos utilizados para coleta de dados em cada área temática descrita acima. Mais detalhes sobre a coleta e o processamento dos dados das diversas áreas temáticas estão disponíveis em procedimentos operacionais detalhados, que permitem a replicação das coletas e o processamento de dados realizados no âmbito do PMC-BS. Os métodos específicos de análise dos dados são descritos no item IV sobre Resultados e Discussão orientados para os objetivos específicos do projeto.

III.1 Plataformas de pesquisa

Uma embarcação do tipo mini *supply*, de 23,7 metros de comprimento e 6,0 metros de boca, foi utilizada como plataforma principal para a coleta de dados das áreas temáticas de Avistagem Embarcada, MAP e Telemetria (**Figura III.1-1**). A embarcação possui acomodações para 12 pesquisadores e 6 tripulantes, e tem autonomia para até 45 dias de mar. A embarcação conta com dois motores Cummins de 325 HP cada.

Dois botes infláveis operaram durante os procedimentos de marcação com transmissores nas Campanhas de Telemetria. O bote inflável principal, utilizado nas últimas campanhas (Ciclos 2 a 6), tinha 6,3 metros de comprimento e motor

de popa de 115 HP (**Figura III.1-2**). Outro bote inflável menor foi utilizado como bote de segurança nas campanhas 2 a 6, e como bote principal na primeira campanha (**Figura III.1-3**). Este bote menor possui 5 metros de comprimento e motor de popa de 50 HP. Os dois botes infláveis possuem uma plataforma de aço inox na proa para facilitar os procedimentos de colocação de transmissores em algumas situações. Durante a segunda campanha, a proa do Sea Route também foi utilizada como plataforma de marcação dos transmissores satelitais em caráter experimental.



Figura III.1-1: Vista geral da embarcação Sea Route, utilizada para as coletas de dados embarcadas nos três primeiros anos do PMC-BS.



Figura III.1-2: Vista geral dos botes infláveis usados nas Campanhas de Telemetria do PMC-BS. Ver texto para detalhes.



Figura III.1-3: Vista geral da torre de observação da embarcação Sea Route e botes infláveis transportados no convés principal.

Um avião *AeroCommander 500* (matrícula PT-KUK) de asa alta foi utilizado nas Campanhas 1 a 4 de Avistagem Aérea (**Figura III.1-4**). A aeronave possui dois motores *Lycoming* convencionais de 290 HP cada, envergadura de 14,95 m, comprimento de 11,22 m, peso máximo de 3.060 kg. No último ano, foi utilizada uma aeronave *Cessna 208B Grand Caravan* (Matrícula PR-CMD) (**Figura III.1-5**). Esta aeronave possui motor turbo-hélice Pratt & Whitney PT6, com envergadura de 15,87 m, comprimento de 11,46 m e peso máximo de 3.969 kg. As aeronaves estavam equipadas com duas janelas em bolha (uma em cada lado da mesma), permitindo uma melhor observação das regiões à frente e abaixo da aeronave. Esta condição permite que os observadores maximizem a detecção de grupos próximos da linha de transecção para satisfazer uma das premissas do método de *Distance Sampling*.



Figura III.1-4: Vista geral da aeronave *AeroCommander 500*, utilizada nos dois primeiros anos (ciclos 1 a 4) do PMC-BS.



Figura III.1-5: Vista geral da aeronave Cessna 208B Grand Caravan, utilizada no último ano (ciclos 5 e 6) do PMC-BS.

III.2 Avistagem Embarcada

A metodologia de transecções lineares com amostragem de distâncias (*Distance Sampling*) foi utilizada durante as Campanhas de Avistagem Embarcada (BUCKLAND et al., 2001), conforme descrito no Projeto Executivo. A metodologia consiste em percorrer um conjunto de linhas de transecção e realizar a contagem de cetáceos ao longo dessas linhas (BUCKLAND et al., 2001). As linhas foram desenhadas para cobrir a Bacia de Santos de forma sistemática e homogênea, permitindo que as contagens sejam extrapoladas para toda a área, visando estimar a densidade e abundância. O traçado das linhas segue um ziguezague que é deslocado entre 60 e 90 km de uma campanha a outra para evitar vieses espaciais na amostragem. O traçado das linhas seguiu uma orientação perpendicular à costa, cruzando o gradiente de profundidades da área de estudo.

A embarcação percorreu as linhas de transecção a uma velocidade média de 7 nós. O esforço amostral foi realizado durante todo o período de luz natural (iniciando entre 6 e 7 horas e finalizando entre 18 e 19 horas), com três

observadores simultâneos posicionados no ponto mais alto da embarcação, em uma torre construída para este fim. O ponto de observação fica a uma altura de aproximadamente 7 metros acima do nível do mar (**Figura III.2-1**). Os três observadores revezaram-se periodicamente com outros dois a três observadores em descanso e procuraram grupos de cetáceos a olho nu e com auxílio de binóculos (7x50 e 15x50). O esforço amostral foi rigorosamente controlado e registrado, tanto temporal como espacialmente (função *track* do GPS).



Figura III.2-1: Detalhe da torre de observação da embarcação com observadores em esforço durante campanhas embarcadas do PMC-BS.

A cada detecção de um grupo de cetáceo, o ângulo horizontal (com uma alidade) e o vertical (com o binóculo reticulado) foram registrados. Isso permitiu a obtenção da distância perpendicular e a correção da posição geográfica (registrada com um GPS). As seguintes informações também foram registradas para cada detecção de cetáceo: hora, espécie ou menor nível taxonômico identificado, tamanho e composição do grupo, presença de filhotes e

comportamento. As espécies foram identificadas com auxílio de guias de identificação (SHIRIHAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIÁ, 2013; JEFFERSON et al., 2015), sempre procurando obter registros fotográficos para auxiliar a identificação.

III.3 Monitoramento Acústico Passivo (MAP)

O monitoramento acústico passivo (MAP) foi realizado conjuntamente com o esforço de observação visual, com exceção de períodos em que as condições climáticas implicavam em paralisação do esforço visual, permanecendo apenas o esforço acústico.

Um arranjo de hidrofones foi rebocado pela embarcação para monitoramento contínuo por dois operadores dedicados a detectar, classificar e localizar todas as detecções acústicas de cetáceos possíveis durante as campanhas de Avistagem e MAP do PMC-BS.

Abaixo, segue uma descrição dos equipamentos de MAP e dos procedimentos de coleta de dados empregados.

Parte Molhada

O arranjo de hidrofones e o cabo de reboque compõem a parte molhada do sistema, e são conectados por conectores à prova d'água. Ambos ficam armazenados em um guincho hidráulico e são lançados ao mar durante o início do esforço e recolhidos no final do dia (**Figura III.3-1**). O cabo é suspenso por três cordas para amortecimento da tensão e passa por um rolete na popa da embarcação (**Figura III.3-2**). Os procedimentos de lançamento e recolhimento do arranjo de hidrofones estão descritos no Procedimento Operacional 04.



Figura III.3-1: Recolhimento do arranjo de hidrofones a partir do guincho hidráulico. O cabo laranja enrolado no guincho é o cabo de reboque.

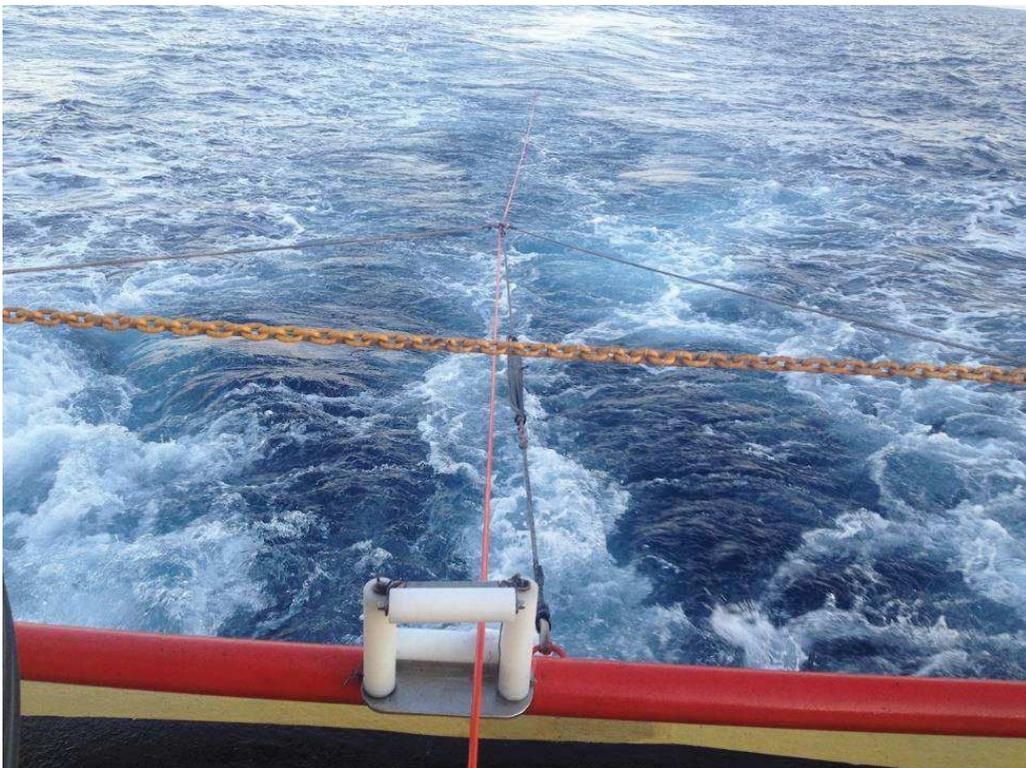


Figura III.3-2: Cabo de reboque do arranjo de hidrofones (cor laranja), lançado da popa da embarcação.

O PMC-BS dispõe de dois arranjos de hidrofones. Os hidrofones e pré-amplificadores estão contidos dentro de um tubo de poliuretano vedado, de aproximadamente 4 m de comprimento, preenchido com óleo inerte (óleo de rícino). Na extremidade anterior, o tubo tem um conector que se acopla ao cabo de reboque. São 4 hidrofones no total, divididos em pares, sendo que há um par para a detecção de eventos acústicos de alta frequência (até 170 kHz) e outro para os eventos acústicos de baixa a média frequência (1 kHz - 48 kHz) (**Tabela III.3-1**).

Os pré-amplificadores possuem ganho de 33 dB e filtro passa-altas com frequência de corte de 1 kHz. Os arranjos também possuem um sensor de pressão hidrostática para o monitoramento da profundidade dos hidrofones (Keller series 7), que pode ser lido diretamente no software PAMGUARD.

Tabela III.3-1: Especificações dos hidrofones usados durante o MAP no PMC-BS.

Característica	Par de frequências baixas a médias	Par de frequências altas
Fabricante (Modelo)	APC (42-1021)	Teledyne Reson (TC 4013)
Diâmetro externo (mm)	19,0 ± 0,15	8,0
Diâmetro interno (mm)	26,0 ± 0,20	ND*
Tamanho (mm)	20,0 ± 0,15	22
Capacitância (nF)	11,6	3,4
Freq. de ressonância (kHz)	83	>200
Resposta de Frequência (kHz)	1 -100	1 -170
Espaçamento entre hidrofones (m)	3,80 m (Turquoise) 2,03 m (Bahia)	1,01 m (Turquoise) 0,53 m (Bahia)

*ND = Não Disponível (não fornecido pelo fabricante)

O cabo de reboque possui 500 m de comprimento total. Ele foi lançado durante a operação 400 m de cabo, resultando na permanência dos hidrofones a uma profundidade na faixa dos 20 - 25 metros. Quando em águas rasas (< 40 m), o cabo era recolhido até a marca de 150 m para permitir a continuidade do MAP. Nessa configuração, o arranjo permanecia em uma profundidade entre 10 e 15 m. O cabo era recolhido completamente e a amostragem paralisada em profundidades inferiores a 20 m, até a embarcação alcançar a profundidade adequada novamente.

Parte Seca

A parte seca consiste no cabo de convés e no Sistema de Processamento Acústico (SPA), localizados no convés superior, onde se encontra a estação de MAP (**Figura III.3-3**).

O cabo de convés possui cerca de 30 m e está conectado ao cabo de reboque para transmitir o sinal até a estação de MAP, onde é conectado um cabo multivias que distribui os sinais dos quatro hidrofones para os respectivos canais do SPA (1 par de canais para cada subsistema). O SPA inclui diversos componentes que condicionam os sinais. Os sinais são amplificados (ganho ajustável de 0 a 40 dB), filtrados (filtro passa-altas de 1 kHz) e digitalizados.

Na 1ª Campanha de Avistagem Embarcada e MAP, o SPA foi alugado da empresa americana Biowaves Inc. O condicionador de sinais utilizado foi o MAGREC e a placa de conversão análogo-digital utilizada foi a RME FIREFACE 800 (taxa de amostragem de 192 kHz). A partir do segundo ano do PMC-BS, foi usado um SPA nacional aprimorado, desenvolvido pela empresa brasileira Ecowaves Ltda. O condicionador de sinal foi customizado para atender às exigências do PMC-BS. Os sinais de cada subsistema passaram por uma filtragem adicional, utilizando filtro passa-baixas: frequência de corte de 48 kHz para o subsistema de frequências baixas-médias e de 170 kHz para o subsistema de frequências altas. O filtro passa-baixas é também chamado de filtro 'antialiasing'. Este filtro evita a contaminação do sinal por frequências acima da capacidade do sistema e representa uma melhoria para a qualidade do sinal. As frequências utilizáveis e as placas de conversão análogo-digital de cada

subsistema são: (a) frequências baixas-médias de 1 a 48 kHz (Placa ASUS taxa de Amostragem de 192 kHz); e (b) frequências altas de 1 a 170 kHz (Placa NIDAQ 6286 - taxa de amostragem de 500 kHz). O SPA possui um sistema de GPS (GPS e Antena Garmin) e placa MC DAQ para registro do sensor de profundidade.



Figura III.3-3: Estação de MAP e operadores durante a Campanha de Avistagem Embarcada e MAP do PMC-BS.

Softwares de MAP

Os softwares utilizados são o PAMGUARD para detecção, localização e classificação de cliques de odontocetos (subsistema de alta frequência) (**Figura III.3-4**) e o ISHMAEL para detecção de assovios e cliques de odontocetos e sons de mysticetos que estejam acima de 1 kHz (subsistema de baixa frequência). Diferente do PAMGUARD, o ISHMAEL não possui um mapa integrado para

realizar a localização dos sinais biológicos e, portanto, é utilizado em conjunto com o software WHALETRAK (desenvolvido pelo NOAA) (Figura III.3-4).

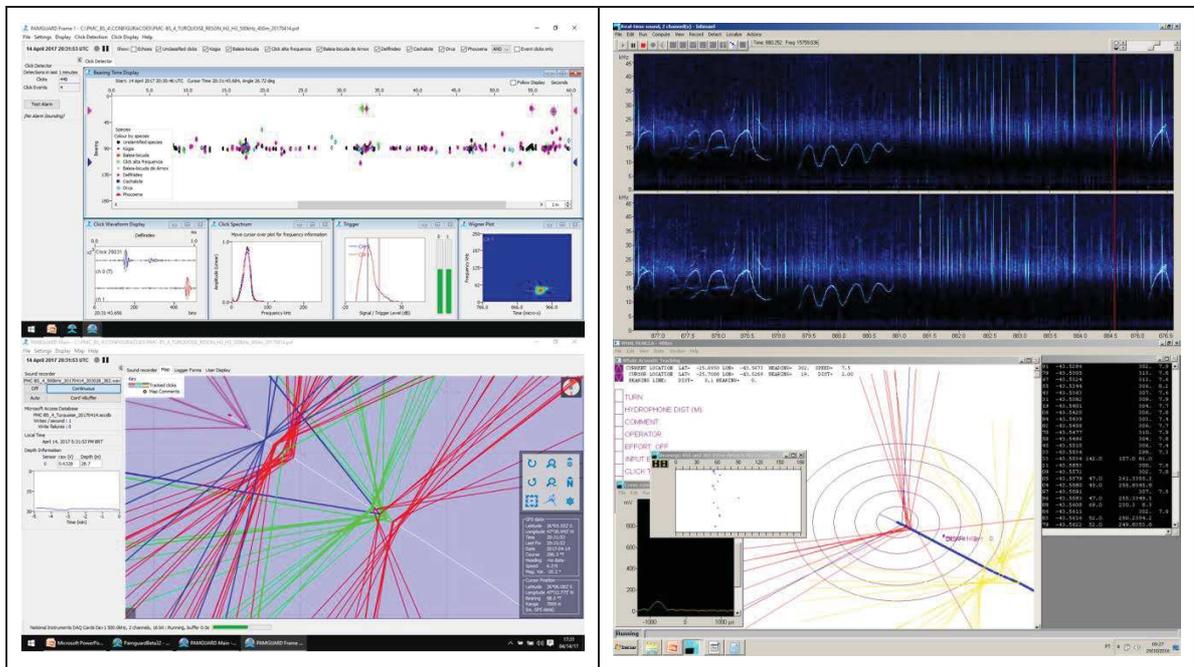


Figura III.3-4: Telas dos softwares usados pelo MAP no PMC-BS: detector de clique do PAMGUARD (acima esq.), mapa para localização do PAMGUARD (abaixo esq.), software ISHMAEL (acima direita) e WHALETRAK (abaixo direita).

Os procedimentos de operação dos softwares e coleta de dados das detecções acústicas de cetáceos durante o trabalho de campo estão descritos no Procedimento Operacional 04 de coleta de dados do MAP. O monitoramento foi feito por dois operadores de MAP simultaneamente, cada um operando um dos computadores com os respectivos softwares. Os operadores trabalhavam juntos para coletar e registrar os dados referentes às detecções acústicas de cetáceos conforme determinava o protocolo. As detecções eram feitas conjuntamente pelos dois operadores e, quando possível, eram comparadas entre os dois softwares para verificar a consistência dos dados coletados. A ficha de detecção foi preenchida com os dados da detecção que obteve os melhores registros entre os dois softwares. Havia sempre três operadores na equipe a bordo revezando em turnos de 2 horas de trabalho e 1 hora de descanso.

As gravações foram feitas de maneira contínua. Além do áudio, os registros incluem os arquivos do banco de dados MS Access que contém os registros do esforço amostral, equipamento utilizado, configurações do sistema de MAP, dados do GPS, profundidade do arranjo de hidrofones e os registros das detecções acústicas de cetáceos. Também são armazenados os arquivos de dados binários do detector de cliques do PAMGUARD, as configurações dos programas utilizados (PAMGUARD e ISHMAEL), base de dados do programa WHALETRAK e imagens de capturas da tela do computador feitas durante a coleta de dados.

Os arquivos de áudio são armazenados no formato WAVE. As gravações do PAMGUARD foram configuradas para duração de 5 minutos e o tamanho dos arquivos é de cerca de 600 MB. As gravações do ISHMAEL foram configuradas para duração de 10 minutos e o tamanho dos arquivos é de cerca de 460 MB. No entanto, quando ocorrem interrupções na gravação, os arquivos podem ser de menor duração e tamanho.

Após o término de cada campanha, os dados de MAP precisam ser validados, classificados e triados. Os procedimentos de validação, classificação e triagem dos dados estão descritos no Procedimento Operacional 06 de processamento de dados do MAP. Finalizada essa etapa, há a geração de planilhas com todas as detecções validadas do MAP de cada campanha que, posteriormente, são inseridas em um sistema online de armazenamento, gerenciamento e visualização de dados (SisPMC).

III.4 Avistagem Aérea

Nas Campanhas de Avistagem Aérea, aplicou-se a metodologia de transecções lineares com amostragem de distâncias (*Distance Sampling*) (BUCKLAND et al., 2001), conforme descrito no **Item II.2**. Uma malha paralela de linhas de transecção foi desenhada para amostragem sistemática da Bacia de Santos. As linhas percorrem a área de estudo, cruzando gradientes de profundidade, posicionadas perpendicularmente à costa. Optou-se por um

desenho amostral contendo um conjunto de linhas paralelas, objetivando uma cobertura homogênea da área de estudo. Cada campanha foi planejada para ser realizada durante uma janela de até 15 dias. Tipicamente as linhas foram percorridas sequencialmente partindo do Sul para o Norte, dependendo das condições climáticas e meteoceanográficas.

Durante o esforço amostral, a aeronave sobrevoou o mar a uma altitude de 750 pés. Esta altitude visa maximizar as detecções tanto de pequenos quanto de grandes cetáceos. A velocidade de sobrevoos é de aproximadamente 240 km/h, que corresponde à velocidade mínima permitida à aeronave, levando em consideração a segurança do sobrevoos. O esforço amostral foi registrado com a função *track* do GPS para posterior obtenção da posição dos registros realizados.

Quatro observadores experientes se revezaram nas posições: (1-2) observadores das janelas planas; (3-4) observadores das janelas em bolha (**Figura III.4-1** e **Figura III.4-2**). A posição inicial dos pesquisadores foi sorteada no início de cada sobrevoos. A rotação de posições foi feita no meio e ao final de uma linha de transecção, ou seja, no máximo a cada 1 hora de sobrevoos. Os observadores procuraram grupos de cetáceos a olho nu de forma independente, sem comunicação nem contato visual entre si. Os mesmos concentraram o esforço de procura na linha e próximo à mesma, “varrendo” periodicamente o horizonte.

O registro do esforço, posições de início e final da linha de transecção, condições ambientais (estado do mar na escala Beaufort, reflexo em cada bordo, condições de visibilidade, cobertura do céu) e as informações relacionadas à cada detecção (espécie, posição geográfica, hora, tamanho do grupo, presença de filhotes, observador e evento que levou à detecção do grupo) foram feitos com auxílio de um gravador digital. O ângulo vertical foi medido no momento em que o grupo avistado estava perpendicular à aeronave, com auxílio de um clinômetro Suunto (**Figura III.4-3**). O ângulo vertical e a altura da aeronave permitiram calcular a distância perpendicular da linha de transecção para cada avistagem.



Figura III.4-1: Observador em esforço amostral na janela bolha da aeronave AeroCommander 500, utilizada durante parte das Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.



Figura III.4-2: Observadores em esforço amostral na aeronave AeroCommander 500, utilizada durante parte das Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.



Figura III.4-3: Observador utilizando clinômetro e gravador digital para registros de avistagem durante as Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.

Os procedimentos de coleta de dados utilizados durante as Campanhas de Avistagem Aérea estão descritos em detalhes no Procedimento Operacional 07.

A fim de garantir a qualidade dos dados, o planejamento dos sobrevoos levou em consideração apenas as condições favoráveis de observação. Os sobrevoos nas áreas costeiras foram realizados majoritariamente com mar igual ou abaixo de Beaufort 3 (vento entre 7-10 nós), e nas áreas oceânicas com mar igual ou abaixo de Beaufort 4 (vento entre 11-16 nós).

III.5 Telemetria

Foram realizadas seis campanhas específicas de marcação com transmissores que percorreram duas rotas em ziguezague, sendo uma na região oceânica (plataforma continental externa e talude) e outra na região costeira (plataforma interna), de Florianópolis/SC a Arraial do Cabo/RJ.

O objetivo foi localizar grupos de cetáceos com potencial para a marcação com transmissores satelitais e/ou DTAGs, cobrindo o máximo possível a área da Bacia de Santos. A operação das Campanhas de Telemetria seguiu duas fases: (a) fase de busca; e (b) fase de marcação. Na fase de busca, seguiu-se o mesmo procedimento do esforço visual usado nas Campanhas de Avistagem Embarcada (ver item II.2 e Procedimento Operacional 08). A fase de marcação consistiu na aproximação do grupo para marcação com transmissores e demais procedimentos (fotoidentificação, biópsia e gravação de sons), após a detecção de um grupo de cetáceos.

A fase de marcação levou em consideração alguns critérios para decidir pela tentativa ou não de marcação, avaliando espécie, tamanho do indivíduo, presença de filhote e comportamento do animal. A decisão pela marcação ou não de um animal foi tomada conjuntamente entre o coordenador de cruzeiro e o responsável pela marcação.

Foram utilizados dois tipos de transmissores (**Figura III.5-1** e **Figura III.5-2**): transmissores satelitais do tipo Splash10 (*Wildlife Computers*) e transmissores arquivais do tipo DTAG para registro acústico e de outras informações, como mergulho. Para os transmissores satelitais, foram utilizadas quatro configurações de âncoras para implantação: (1) configuração implantável com uma âncora acoplada de três pétalas dobráveis (até a 3ª Campanha); (2) configuração implantável com uma âncora fixa de três pétalas e roseta (a partir da 4ª Campanha); (3) configuração LIMPET com duas âncoras de três pétalas (todas as campanhas); e (4) configuração LIMPET com duas âncoras de seis pétalas (todas as campanhas). No caso dos DTAGs, o sistema de fixação é formado por quatro copos de sucção (ventosas).

Nas três primeiras campanhas, o método de marcação consistiu em um rifle de ar comprimido para os transmissores satelitais (RESTECH ARTS) e numa vara de fibra de carbono para os DTAGs. Na quarta campanha, o principal equipamento utilizado para instalar os transmissores na configuração LIMPET foi primariamente uma balestra de 150 libras de pressão (EXCALIBUR VIXEN II).

Os transmissores satelitais coletaram as seguintes informações: (a) hora; (b) posições geográficas (via sistema satelital Argos); (c) profundidade de mergulho; (d) duração do mergulho; e (e) comportamento de mergulho. Esses dados foram comprimidos e resumidos para que pudessem ser enviados via satélite.

Os dados coletados pelos transmissores satelitais foram recebidos pelo sistema ARGOS. Dada a incerteza no posicionamento dos transmissores por esse sistema, cada posição tem um erro associado que é classificado de acordo com sua precisão em sete classes definidas de acordo com o número de mensagens recebidas pelo transmissor durante a(s) passagem(ns) do(s) satélite(s). São elas: “3” (erro menor que 250 m), “2” (entre 250 e 500 m), “1” (entre 500 e 1500 m), “0” (maior que 1500 m), “A” (sem estimativa de precisão, três mensagens de satélite), “B” (sem estimativa de precisão, 1 ou 2 mensagens de satélites) e “Z” (localização inválida). As posições classificadas como “Z” foram excluídas das análises.

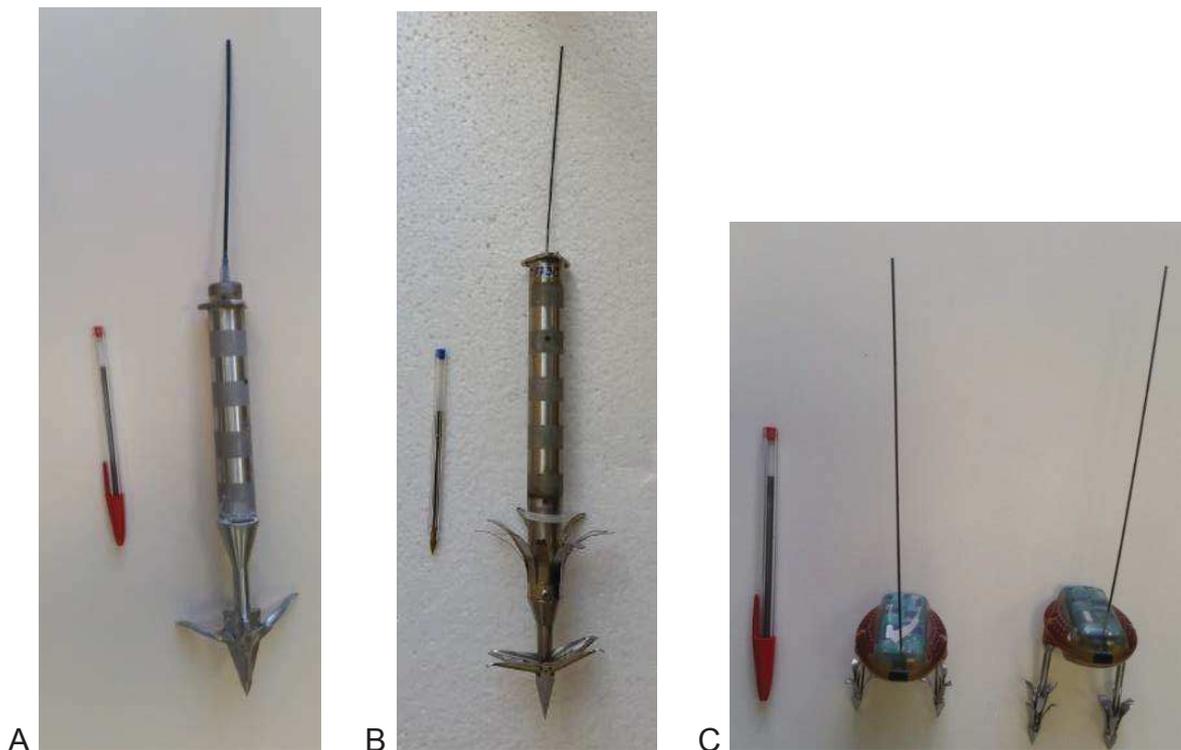


Figura III.5-1: Transmissores satelitais utilizados nas Campanhas de Telemetria do PMC-BS: (A) transmissor implantável (modelo SPLASH10-260C); (B) transmissor implantável (modelo SPLASH10-302B); e (C) transmissor LIMPET (modelo SPLASH10-292A) com âncora de três (esquerda) e seis pétalas (direita).

Os DTAGs são dispositivos não invasivos, equipados com quatro ventosas, adequados para pesquisa de ecologia comportamental e acústica de cetáceos. Esses dispositivos, desenvolvidos e alugados pelo Instituto Oceanográfico de Woods Hole (WHOI), contêm sensores de pressão, acelerômetros e magnetômetros, que possibilitam descrever a orientação do animal nos três eixos e a profundidade de mergulho. Além disso, os DTAGs também estão equipados com um par de hidrofones, com taxa de amostragem de até 192 kHz, que permitem registrar o áudio, determinar os níveis sonoros recebidos e calcular os ângulos de chegada dos sons detectados no DTAG (JOHNSON & TYACK, 2003).

O animal focal era acompanhado até o momento em que o DTAG se desprendia. O DTAG era então rastreado, com o auxílio de antenas direcionais *Yagi* ligadas a receptores de sinais VHF. Assim que recuperados, os DTAGs eram examinados em busca de amostras de pele para biopsia, de acordo com o

protocolo descrito por MILLER et al. (2004). Os dados dos DTAGs eram descarregados em um computador via transmissão infravermelha e conferidos para verificar se os dados foram coletados e descarregados adequadamente.

As análises foram feitas por meio de algoritmos disponíveis no programa MATLAB (Dtag Tools) (JOHNSON et al., 2013). O processamento dos dados incluiu: decimação dos dados de 50 Hz (taxa de amostragem padrão) para 5 Hz; calibração para a conversão dos dados de pressão para os valores de profundidade (metros) e avaliação da posição do DTAG em relação ao eixo do corpo do animal. Este último é necessário para calibrar os dados que medem a rotação, inclinação e rumo do animal marcado, de maneira a gerar resultados confiáveis (JOHNSON & TYACK, 2003; MILLER et al., 2005). Após essas etapas, foram feitos os cálculos das estimativas das taxas de propulsão da nadadeira caudal (NOWACEK et al., 2001). Os dados processados foram analisados para quantificar a métrica de mergulho e avaliar manualmente a existência de possíveis comportamentos de forrageio, usando as técnicas descritas por GOLDBOGEN (2006), GOLDBOGEN et al. (2007), STIMPERT et al. (2007) e GOLDBOGEN et al. (2013).

Os registros acústicos foram processados para verificar a presença de sons de origem biológica ou quaisquer outros sons considerados relevantes. Sons de mysticetos foram escaneados seguindo as técnicas descritas por CONSTANTINE et al. (2015), e as vocalizações encontradas foram quantificadas e descritas utilizando os programas MATLAB e RAVEN PRO 1.5 (Bioacoustic Research Program, 2011).

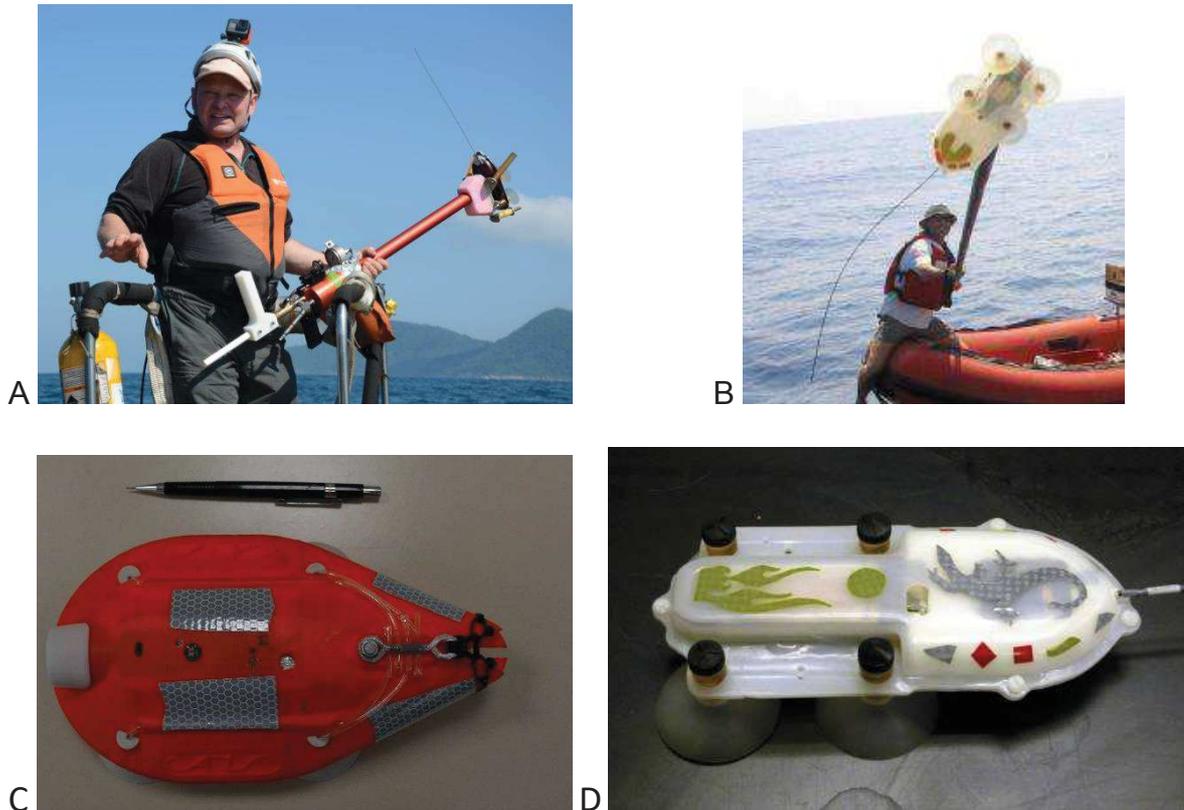


Figura III.5-2: Transmissores do tipo CATS Cam e DTAG, o primeiro utilizado apenas na Campanha 6 e o segundo nas Campanhas de 1 a 6: (A) sistema de fixação com rifle ARTS; (B) sistema de colocação com vara de fibra de carbono; (C) Transmissor do tipo CATS Cam; e (D) Transmissor do tipo DTAG do Instituto Oceanográfico de Woods Hole.

Estratégia de marcação

A principal estratégia utilizada para a marcação dos animais foi a aproximação com bote inflável. Nesse caso, os dois botes (bote principal e bote de apoio) foram lançados ao mar com suas respectivas equipes (ver Procedimento Operacional 08) (**Figura III.5-3** e **Figura III.5-4**). Observadores sempre foram mantidos no navio para auxiliar no monitoramento dos botes, na localização dos animais e no preenchimento das fichas de campo, em constante troca de informações com os botes via rádio. Na 2ª Campanha, alguns procedimentos de marcação foram realizados de um navio em caráter experimental nos dias em que as condições do mar não permitiram a descida dos

botes. Mas dada a maior distância entre os animais e o responsável pela colocação dos tag, esse método não foi utilizado nas campanhas subsequentes. Todas as informações relativas aos procedimentos de marcação foram registradas em formulário de campo específico.



Figura III.5-3: *Marcação com transmissor satelital de uma orca (Orcinus orca) utilizando o rifle de ar comprimido durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.*



Figura III.5-4: Marcação com transmissor do tipo DTAG em uma baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) utilizando uma vara de fibra de carbono durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.

III.6 Fotoidentificação

Os dados de fotoidentificação foram coletados conforme previsto no projeto executivo, tanto nas campanhas de Avistagem e MAP, quanto nas campanhas de Telemetria. Assim, durante as campanhas, foram realizadas sessões de fotoidentificação sempre que um indivíduo ou grupos de indivíduos de qualquer espécie eram observados, conforme protocolos tradicionais e bem estabelecidos na literatura (cf. KATONA & WHITEHEAD, 1981; WÜRSIG & JEFFERSON, 1990; WILLIAMS et al., 1993).

Após o término de cada campanha, todos os registros fotográficos foram repassados e armazenados em computadores e HDs externos do Laboratório de Mamíferos Aquáticos, da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAQ – UFSC), para posterior triagem, catalogação e processamento de identificação (detalhes no Procedimento Operacional de Fotoidentificação 09). Em um primeiro procedimento, todos os arquivos digitais foram separados por campanha, dia, fotógrafo e espécie. Na sequência, o volume (em número de fotos e GBs) de arquivos a serem processados em cada campanha foi quantificado.

Como rotina de análise das fotos, definiram-se três etapas (conforme

estabelecido no Procedimento Operacional Fotoidentificação 09): uma primeira rodada de triagem; uma segunda de catalogação; e uma última de processamento de identificação. Durante a etapa inicial de triagem, cada foto foi classificada quanto à qualidade e se era ou não utilizável para fotoidentificação. Como critério de qualidade, definiram-se: (A) excelente; (B+) boa; (B-) razoável; (C) ruim; e (D) péssima. Na segunda rodada, catalogação, todas as fotos foram reavaliadas e aquelas de novos indivíduos (ainda não presentes no catálogo de referência do PMC), de qualidade (A) ou (B+), eram incluídas em catálogo de referência em elaboração. Nessa etapa de catalogação, as fotos selecionadas eram cuidadosamente comparadas com as fotos preexistentes no catálogo de referência. A comparação se deu pela observação de marcas naturais específicas de longa duração, conforme definido em literatura (cf. PAYNE, 1976; WURSIG & WURSIG, 1977; KATONA & WHITEHEAD, 1981). Sempre que aparecia uma foto de qualidade, de um indivíduo com marcas de longa duração, que ainda não estava presente no catálogo de referência, ela recebia um número de nova identificação e era então incluída ao catálogo.

Para cada espécie foi construído um catálogo de referência e uma matriz de dados gerais de fotoidentificação. No entanto, os procedimentos de triagem e de catalogação inicial ocorriam por ordem cronológica do registro. Apenas na última etapa, de processamento de identificação, uma terceira rodada de avaliação das fotos era realizada por espécie. Nesse momento, todos os registros de qualidade (A), (B+) e (B-) foram comparados com os catálogos de referência já montados, por espécie, para a busca por correspondentes, ou seja, para identificação dos indivíduos. Em caso de identificação positiva, o número do indivíduo catalogado era vinculado ao registro fotográfico em análise. Em caso de não reconhecimento com os indivíduos catalogados, e quando a qualidade da foto não permitia a catalogação de um novo indivíduo, o registro em análise era classificado como não identificado (NI).

Por fim, na triagem inicial e nas duas últimas rodadas de observação das fotos, todas as lesões epidérmicas de interesse e/ou mutilações foram separadas e avaliadas. Todas os registros de lesões foram copiados para pastas específicas por espécies. Foi avaliada prevalência de lesões por espécie e uma descrição

qualitativa das lesões mais explícitas e frequentes. A partir do segundo ano, foi realizada uma categorização e descrição mais refinada de cada tipo de lesão, além de uma quantificação de cada tipo de lesão por espécie.

Após todas as etapas de processamento dos registros fotográficos, foi realizado um acompanhamento do número total de registros utilizados por espécies, bem como um acompanhamento do número de indivíduos incluídos em cada catálogo de referência (por espécie). Também foi realizada, por campanha e espécie, uma avaliação no número de registros identificados. Históricos de captura e mapas de distribuição dos registros foram elaborados para as espécies com maior volume de dados, e quando da ocorrência de “recapturas”, ou seja, reconhecimento de indivíduo já catalogado em outro dia de campo.

Também foram realizadas comparações do catálogo do PMC-BS com os de outros grupos de pesquisa. A mesma equipe envolvida no processamento das fotos do PMC-BS foi responsável por todo o procedimento de comparação. Ou seja, os catálogos de outros grupos de pesquisa foram disponibilizados para a coordenação de fotoidentificação do PMC-BS. Todos os *matches* identificados eram planilhados incluindo data e localização de cada registro. Essas informações foram utilizadas para a confecção de mapas de ocorrência por indivíduos.

III.7 Coleta de biópsias

Biópsias foram coletadas durante as Campanhas de Avistagem Embarcada/MAP e de Telemetria utilizando balestras (120 e 150 bar de pressão) e dardos flutuantes (corpo de fibra de carbono e flutuador de poliuretano) com ponteiros de aço inoxidável especialmente desenvolvidas para amostragem de cetáceos (CETA-DART, Copenhagen, Dinamarca). Nas Campanhas de Avistagem Embarcada/MAP, as biópsias foram realizadas principalmente da proa da embarcação (**Figura III.7-1**), amostrando delfínídeos em comportamento de *bow-riding* (nadando na frente da proa), de forma oportunista. Nas Campanhas de Telemetria, as biópsias foram feitas tanto da proa da embarcação quanto do bote inflável, utilizado para realizar os

procedimentos de marcação. Para cetáceos de pequeno e médio porte, foram utilizados dardos com ponteiras de 25 mm, próprias para pequenos cetáceos, disparados pela balestra de 120 bar de pressão. Para cetáceos de grande porte, foram utilizados dardos com ponteiras de 40 mm disparados pela balestra de 150 bar de pressão.



Figura III.7-1: Coleta de biópsia da proa da embarcação Sea Route durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.

Durante os três anos, foram também coletadas na água amostras de pele que se desprenderam de alguns espécimes de mysticeto (baleia-de-Bryde, baleia-jubarte e baleia-azul). É comum que peles se desprendam de algumas espécies de mysticeto durante os comportamentos aéreos, sendo sua coleta uma alternativa oportunista e não intrusiva de obter amostras desses animais (VALSECCHI et al., 1998).

O fracionamento de cada amostra de biópsia foi realizado após a coleta (**Figura III.7-2**), separando material biológico para as análises de contaminantes, de biomarcadores e de genética.

Os procedimentos para o fracionamento, a identificação e o acondicionamento das amostras estão descritos em detalhes no Procedimento

Operacional 02. Cada biópsia feita resulta no preenchimento de uma ficha de biópsia pelo profissional envolvido na coleta ou no fracionamento da amostra, com informações como: data, hora, número da biópsia, responsável pela coleta e fracionamento, espécie ou menor nível taxonômico identificado, coordenadas geográficas, condição do tempo, estado do mar, tamanho e composição do grupo, reação do animal antes, durante e depois da biópsia.



Figura III.7-2: Triagem da amostra de biópsia coletada durante Campanha de Telemetria do PMC-BS.

IV. ESFORÇO E TAMANHO AMOSTRAL POR ÁREA TEMÁTICA

Este item apresenta um resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante as 18 campanhas executadas no âmbito do PMC-BS nestes três primeiros anos de projeto (**Quadros III-1 e III-2**). A ênfase das informações apresentadas neste item é no esforço amostral empregado nos três primeiros anos de projeto. O tamanho amostral também foi sumarizado, como o número de detecções de grupos de cetáceos, número de amostras de biópsia coletadas e número de animais foto-identificados ou marcados com transmissores. Todas as informações apresentadas neste relatório estão inseridas e disponíveis online no sistema de armazenamento e visualização de dados do PMC-BS (SisPMC), que pode ser acessado no seguinte endereço: <http://sispmc.socioambiental.com.br/sispmc/>.

Quadro III-1: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 1 e 2 do PMC-BS.

INDICADORES	Ciclo 1			Ciclo 2		
	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria
Período da Campanha	07/12/2015 – 13/12/2015	27/11/2015 – 05/01/2016	22/02/2016 – 17/03/2016	28/03/2016 – 04/04/2016	10/05/2016 – 20/06/2016	10/08/2016 – 03/09/2016
Estação do Ano	Final da primavera	Final primavera / início do verão	Final do verão	Início do outono	Final do outono	Inverno
Dias de mobilização	12	41	25	9	42	25
Dias com amostragem	7	Avistagem: 37 MAP: 35	22	7	Avistagem: 40 MAP: 40	24
Esforço amostral (horas)	24	389,9	246,3	29,1	410,9	248,2
Esforço amostral (km)	5.719,9	Avistagem: 4.937,1 MAP: 4.668,9	2.850,8	4.873,9	Avistagem: 5.462,5 MAP: 5.191,2	2.603,2

Quadro III-2: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 3 e 4 do PMC-BS.

INDICADORES	Ciclo 3			Ciclo 4		
	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria
Período da Campanha	20/09/2016 - 30/09/2016	27/09/2016 – 06/11/2016	31/01/2017 - 24/02/2017	27/01/2017 - 06/02/2017	08/03/2017 – 18/04/2017	05/07/2017 - 29/07/2017
Estação do Ano	Início da primavera	Primavera	Verão	Verão	Verão/outono	Inverno
Dias de mobilização	10	41	25	10	42	27
Dias com amostragem	9	Avistagem: 36 MAP: 36	24	10	Avistagem: 39 MAP: 38	24
Esforço amostral (horas)	27,5	420,1	288,4	27,33	434,9	329,7
Esforço amostral (km)	7.326	Avistagem: 5.500,2 MAP: 5.235,6	3.382,3	6.546,8	Avistagem: 5.541,9 MAP: 5.241,2	3.386,9

Quadro III-3: Resumo executivo dos dados coletados por cada área temática durante os Ciclos 5 e 6 do PMC-BS.

INDICADORES	Ciclo 5			Ciclo 6		
	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria	Avistagem Aérea	Avistagem Embarcada e MAP	Telemetria
Período da Campanha	03/12/2017 – 11/12/2017	25/08/2017 – 07/10/2017	28/10/2017 – 21/11/2017	19/04/2018 – 27/04/2018	12/01/2018 – 20/02/2018	21/03/2018 – 14/04/2018
Estação do Ano	Primavera	Inverno /primavera	Primavera	Outono	Verão	Outono
Dias de mobilização	10	44	29	9	41	27
Dias com amostragem	9	Avistagem: 40 MAP: 40	25	7	Avistagem: 40 MAP: 40	24
Esforço amostral (horas)	30	Avistagem: 435,7 MAP: 408,5	276,5	27	Avistagem: 444,3 MAP: 426,5	261,5
Esforço amostral (km)	5,989	Avistagem: 5.583,8 MAP: 5.187,5	2.920,6	5.666	Avistagem: 5.863,4 MAP: 5.606	3.122,5

IV.1 Avistagem Embarcada

Foram realizadas seis campanhas embarcadas nos três primeiros anos do PMC-BS, percorrendo-se um total de 17.759,2 milhas náuticas em esforço durante 229 dias de campo (**Tabela IV.1-1** e **Figura IV.1-1**). Em média, a cada dia, aproximadamente 78 milhas náuticas foram percorridas e 11 horas de esforço de procura por cetáceos foi realizado.

Ao longo das seis campanhas de avistagem, foram detectados visualmente 522 grupos de cetáceos, sendo que 484 grupos em esforço sistemático (92,7%) e o restante em linhas de deslocamento fora da malha sistemática de transecções ou durante pausas na amostragem para descanso ou abrigo de tempo ruim. Foram identificadas 21 espécies de cetáceos nas seis campanhas de avistagem, com uma média de aproximadamente 12 espécies identificadas por campanha.

Tabela IV.1-1: Resumo do esforço e tamanho amostral nas Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS.

Indicadores	Campanhas de Avistagem Embarcada e MAP						TOTAL
	1	2	3	4	5	6	
Período da campanha	27/11/15 – 05/01/16	10/05/16 – 20/06/16	27/09/16 – 06/11/16	08/03/17 – 18/04/17	25/08/17 – 07/10/17	12/01/18 – 20/02/18	-
Dias de mobilização	40	42	41	42	44	40	249
Dias com amostragem	37	40	36	39	40	37	229
Esforço amostral (horas)	389,9	410,9	420,1	434,9	435,7	449,0	2.540,5
Média de horas por dia	10,5	10,3	10,2	11,2	10,9	12,1	11,1
Esforço amostral (milhas náuticas)	2.665,8	2.949,5	2.969,9	2.992,4	3.015,5	3.166,1	17.759,2
Média de milhas náuticas por dia	72,0	73,7	72,44	71,20	75,4	85,6	77,6
Número de grupos de cetáceos total	53	83	121	65	123	77	522
Número de grupos de cetáceos em esforço	47	76	115	56	121	69	484
Média de grupos por dia em esforço	1,3	1,9	3,2	1,4	3,1	2,1	2,3
Número mínimo de espécies identificadas*	12	13	14	10	11	11	21

* Inclui espécies observadas fora de esforço sistemático e gêneros sem confirmação da espécie.

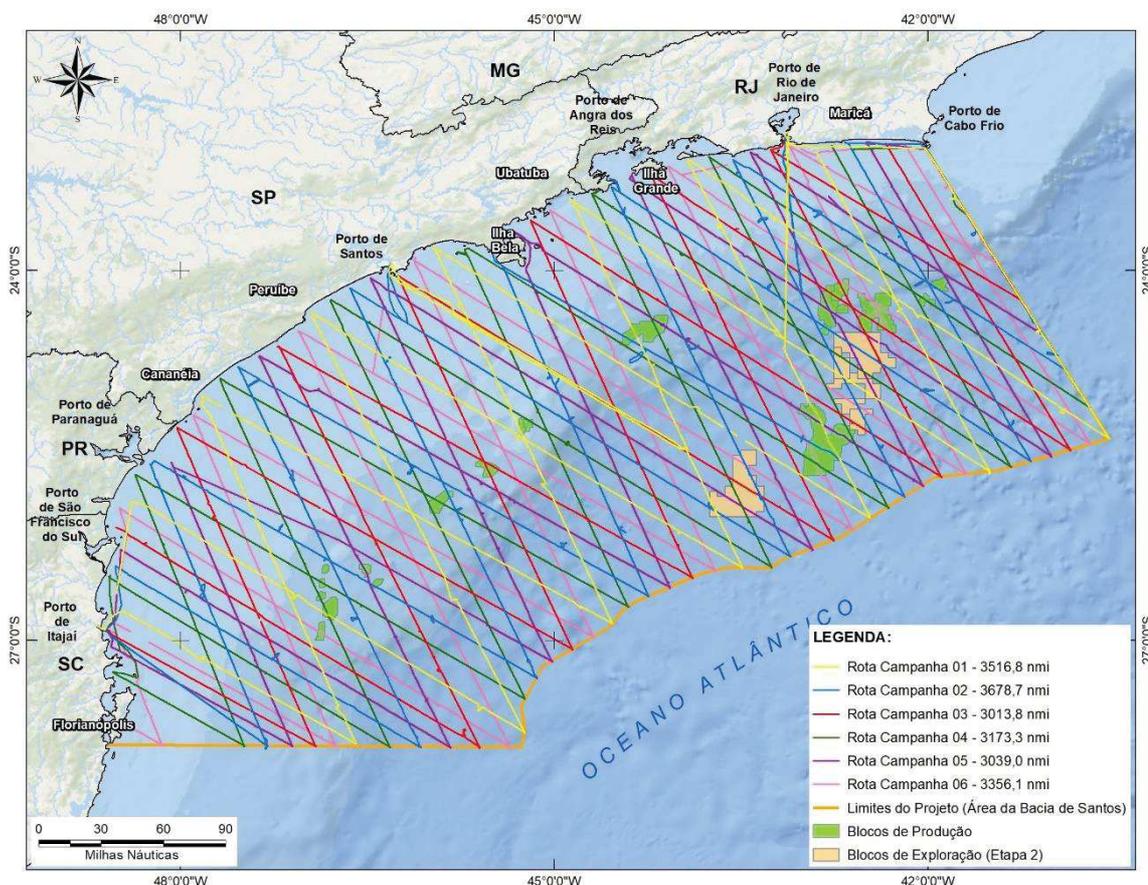


Figura IV.1-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Avistagem Embarcada nos três primeiros anos do PMC-BS.

IV.2 Monitoramento Acústico Passivo

Nestes três anos do PMC-BS, foram realizadas seis Campanhas Embarcadas de Avistagem e MAP. O esforço de Monitoramento Acústico Passivo foi feito durante todas as campanhas, em conjunto com o esforço de Avistagem. A **Tabela IV.2-1** apresenta o esforço amostral efetivo, incluindo o total e a média de horas de esforço diário, milhas náuticas percorridas, número de detecções acústicas de cetáceos e o total de espécies identificadas. O esforço de MAP dos três anos do PMC-BS totalizou 2.398 horas e 16.809 milhas náuticas percorridas, sendo

registradas 645 detecções acústicas de cetáceos.

No total de todas as campanhas, foram gerados 47.278 arquivos de áudio e um volume de 18,2 Terabytes (TB) de gravação contínua. A **Tabela IV.2-2** apresenta o número total de arquivos de áudio e o volume de dados gerados para as seis campanhas executadas.

Tabela IV.2-1: Resumo do esforço e tamanho amostral nas Campanhas de MAP do PMC-BS.

Indicadores	Campanhas de Avistagem Embarcada e MAP						TOTAL
	1	2	3	4	5	6	
Período da campanha	27/11/15 – 05/01/16	10/05/16 – 20/06/16	27/09/16 – 06/11/16	08/03/17 – 18/04/17	25/08/17 – 07/10/17	12/01/18 – 20/02/18	-
Dias de Mobilização	41	42	41	42	44	40	250
Dias com Amostragem	33	40	36	38	40	37	224
Esforço Amostral (horas)	357,2	398,7	397,5	409,7	408,5	426,5	2.398,0
Média de horas de esforço por dia	10,8	10,0	11,0	10,8	10,2	11,5	10,7
Esforço Amostral (milhas náuticas)	2.521,0	2.803,0	2.827,0	2.830,0	2.801,0	3.027,0	16.809,0
Média de milhas náuticas por dia	76,4	70,0	68,9	67,4	73,7	81,8	75,0
Número de Detecções Acústicas	82	99	139	92	134	99	645
Média de Detecções (diário)	2,5	2,5	3,9	2,4	3,4	2,7	2,8
Número de Espécies Identificadas*	09	09	12	10	09	09	15

* Número de espécies com registros acústicos validados e catalogados. A identificação foi feita pelo método visual ou acústico. Pode incluir táxons com identificação por espécie, gênero ou até mesmo família, no caso de espécies mais raras. Detecções acústicas de grupos com mais de uma espécie presente (grupos mistos) não foram incluídas.

Tabela IV.2-2: Lista do número total de arquivos de áudio e volume do PAMGUARD e do ISHMAEL separados por ciclo e o total para os três anos de PMC-BS. ISH = gravações do programa ISHMAEL. PAM = gravações do programa PAMGUARD.

Ciclo	Número de Arquivos ISH	Volume Total ISH (TB)	Número de Arquivos PAM	Volume Total PAM (TB)	Total Arquivos ISH + PAM	Volume Total ISH + PAM (TB)
1	2.341	0,95	4.747	2,55	7.088	3,49
2	2.566	0,99	5.039	2,61	7.065	3,60
3	2.519	1,02	5.340	2,63	7.859	3,65
4	2.715	1,03	5.724	2,67	8.439	3,70
5	2.652	1,01	5.441	2,67	8.040	3,66
6	2.944	1,09	5.843	2,78	8.787	3,87
Total	15.737	6,08	32.134	15,90	47.278	18,27

No total de três anos do PMC-BS, foram registradas e validadas 645 detecções acústicas de cetáceos, com uma média de 2,8 detecções por dia. Os registros acústicos identificados por espécie, gênero ou até mesmo família (para táxons mais raros como as baleias-bicudas) foram catalogados na SONOTECA do PMC-BS, totalizando 201 detecções que representaram pouco mais de 30% do total dos registros acústicos de cetáceos realizados. Estes registros estão representados por 15 táxons diferentes (**Tabela IV.2-3**). A maioria dos táxons foi identificada em detecções conjuntas com a equipe de avistagem, com poucas exceções, nas quais foi possível fazer a identificação somente pelo registro acústico, conforme será discutido adiante. Para a maioria das detecções acústicas, não houve avistagens pela equipe visual. Por isso, muitas foram classificadas apenas por ordem ou família.

Tabela IV.2-3: Número de registros acústicos realizados durante os três anos do PMC-BS, identificados pelos diferentes grupos taxonômicos catalogados na SONOTECA.

Táxon/Campanha	Campanhas de MAP						Total
	1	2	3	4	5	6	
<i>Stenella longirostris</i>	2	2	2	0	1	3	10
<i>Stenella attenuata</i>	2	3	2	1	0	0	8
<i>Stenella clymene</i>	0	1	1	0	0	1	3
<i>Stenella frontalis</i>	2	9	5	15	8	21	60
<i>Tursiops truncatus</i>	1	2	0	3	0	4	10
<i>Steno bredanensis</i>	0	2	1	0	0	1	4
<i>Grampus griseus</i>	1	3	0	1	1	0	6
<i>Globicephala</i> sp.	1	0	6	0	2	0	9
<i>Delphinus</i> sp.	0	0	2	0	0	1	3
<i>Feresa attenuata</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>Physeter macrocephalus</i>	8	7	2	2	5	2	26
<i>Kogia</i> sp.	2	1	4	2	4	1	14
<i>Pontoporia blainvillei</i>	1	0	0	1	0	0	2
Ziphiidae	0	0	2	1	4	0	7
<i>Megaptera novaeangliae</i>	0	0	9	0	28	0	37
Total	20	30	36	27	53	35	201

Um total de 444 detecções (69% dos registros acústicos) não foi catalogado na Sonoteca. Nesses casos, não houve pareamento da detecção com a amostragem visual ou houve pareamento, mas a espécie não foi identificada. Também houve caso de grupos mistos (interações interespecíficas entre duas ou mais espécies), igualmente não registrados na Sonoteca por não se conseguir identificar qual espécie produziu cada sinal acústico.

IV.3 Avistagem Aérea

Foram realizadas seis Campanhas de Avistagem Aérea, totalizando um esforço amostral de 36.122 km percorridos em 169,95 horas durante 41 dias, com 4 horas de trabalho por dia, avistando-se, em média, 8 grupos (**Tabela IV.3-1** e

Figura IV.3-1). À exceção do ocorrido na primeira campanha, as demais transcorreram em um período médio de sete dias, com eventuais paralisações causadas pelas condições meteorológicas e oceanográficas inapropriadas, que oscilam em demasia, tendo em vista o tamanho da área amostrada. Todavia, todas ocorreram dentro do intervalo previsto de quinze dias.

Tabela IV.3-1: Resumo do esforço e tamanho amostral das Campanhas de Avistagem
Área do primeiro ano do PMC-BS.

Indicadores	1	2	3	4	5	6	TOTAL
Período da campanha	07/12/15	28/03/16	21/09/16	30/01/17	01/12/17	20/04/18	-
	–	–	–	–	–	–	
	13/12/15	04/04/16	29/09/16	05/02/17	11/12/17	27/04/18	
Dias de mobilização	12	9	12	13	10	8	64
Dias com amostragem	7	7	7	7	6	7	41
Esforço amostral (horas)	24,0	34,3	27,5	27,33	29,9	26,92	169,95
Média de horas por dia	3,4	4,9	3,93	3,9	4,98	3,85	4,16
Esforço amostral (km)	5.720	4.874	7.326	6.547	5.989	5.666	36.122
Número de grupos de cetáceos total	50	73	56	23	59	84	393
Média de grupos por dia em esforço	7,1	10,4	8,0	3,3	9,8	12,0	8,43
Número de espécies identificadas*	4	12	5	2	11	14	15

* Inclui gêneros sem confirmação da espécie.

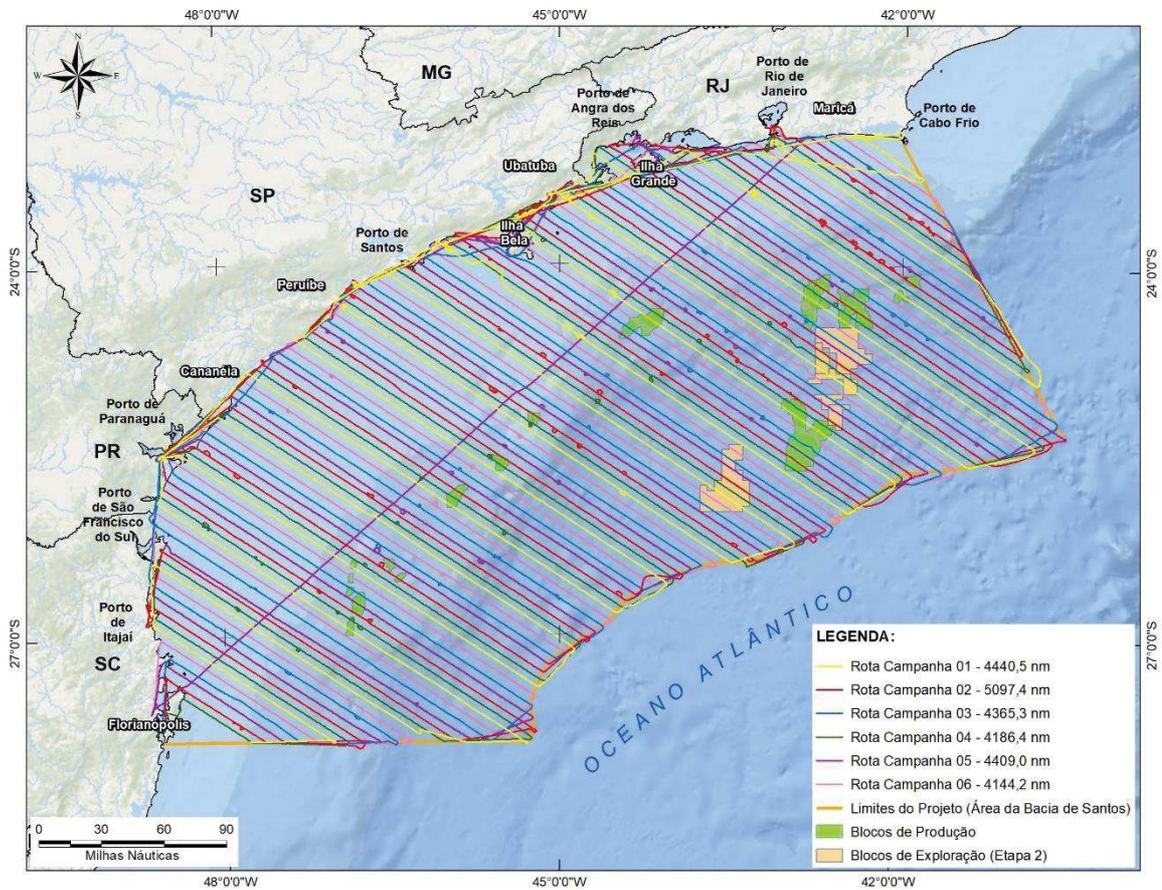


Figura IV.3-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Avistagem Aérea nos três primeiros anos do PMC-BS.

IV.4 Telemetria

As seis Campanhas de Telemetria realizadas até o momento totalizaram 104 dias de amostragem, com 6.600,1 milhas náuticas percorridas e 1.113,1 horas de esforço amostral (**Tabela IV.4-1** e **Figura IV.4-1**). Foram detectados 413 grupos de cetáceos pertencendo a pelo menos 21 espécies (ver item IV.1).

Quarenta e seis transmissores satelitais foram utilizados até o momento. Dez foram perdidos por falha no procedimento de instalação (21,7%), enquanto cinco (10,9%) não transmitiram dados. Esse fato pode estar relacionado a problemas

técnicos no transmissor, embora todos tenham sido testados previamente, ou mesmo à posição de fixação do transmissor no corpo do animal, que pode não ter favorecido a transmissão de dados. Um total de 31 transmissores (67,4%) produziram dados relativos à nove espécies de cetáceos, sendo cinco mysticetos e quatro odontocetos (**Tabela IV.4-2**). Desses, sete transmissores eram da configuração implantável e 24 da configuração LIMPET. *Tursiops truncatus* foi a espécie com o maior número de indivíduos marcados ($n = 10$), seguido da baleia-jubarte ($n = 6$).

O maior número de tentativas de marcação com transmissores satelitais ocorreu na 2ª Campanha ($n = 23$), enquanto o maior sucesso de marcação ocorreu na 3ª Campanha (80%), quando também houve o menor número de tentativas de marcação ($n = 5$). O maior número de cetáceos de grande porte registrados nas campanhas de inverno e primavera foi o principal fator relacionado a um maior número de tentativas de marcação nas campanhas dessas estações, assim como de transmissores utilizados.

Ao longo de três anos, foram colocados tags arquivais (DTAGs) em cinco espécies de mysticetos e duas espécies de odontocetos, totalizando 12 procedimentos de instalação com sucesso.

Tabela IV.4-1: Parâmetros de esforço de campo realizado nas Campanhas de Telemetria em três anos do PMC-BS.

Parâmetros	Campanhas de Telemetria						TOTAL/MÉDIA
	1	2	3	4	5	6	
Período da campanha	22/02/16 - 17/03/16	10/08/16 - 03/09/16	31/01/17 - 24/02/17	05/07/17 - 10/08/17	28/10/17 - 21/11/17	21/03/18 - 14/04/18	-
Dias de campanha	25	25	25	37	25	25	Total: 112 Média: 28
Dias de esforço	22	24	24	34	24	24	Total: 104 Média: 26
Esforço amostral (horas)	246,3	248,2	288,4	329,7	269,2	261,6	Total: 1.113,1 Média: 278,3
Esforço amostral (milhas náuticas)	1.579,3	1.405,6	1.826,3	1.828,8	1.818,7	1.686,3	Total: 6.600,1 Média: 1.650
Esforço amostral (milhas náuticas) na região costeira/ocêânica	704,2/ 875,1	872,5/ 533,1	851,4/ 974,9	904,1/ 924,7	1.281,7/ 537,0	773,8/ 912,5	Total: 3.332,2/ 3.307,8
Dias amostrados na região costeira/ocêânica	11/11	14/10	12/12	17/17	16/8	13/11	Total: 54/50 Média: 14/13
Número de avistagens de cetáceos	52	96	44	121	64	36	Total: 413 Média: 68,8
Número de espécies registradas	10	10	9	14	10	9	Total: 22 Média: 10,3
Número de indivíduos registrados	1.181	1.034	1.267	1.212	1.415	3.598	Total: 9.707

Parâmetros	Campanhas de Telemetria						TOTAL/MÉDIA
	1	2	3	4	5	6	
							Média: 1.617,8
Número de tentativas de marcação com transmissor satelital	10	23	5	17	18	10	Total: 83 Média: 13,8
Número de animais marcados com sucesso com transmissor satelital	2	14	4	6	5	5	Total: 36 Média: 6
Número de espécies marcadas com sucesso com transmissor satelital	1	6	1	5	2	2	Total: 9 Média: 2,8
Taxa de sucesso de colocação de transmissores*	20,0%	60,9%	80,0%	35,3%	27,8%	50,0%	Total: 45,7% Média: 44,8%
Número de tentativas de marcação com DTAG	3	2	7	5	10	1	Total: 28 Média: 4,7
Número de animais marcados com DTAG	1	1	1	3	5	1	Total: 12 Média: 2
Número de espécies marcadas com DTAG	1	1	1	3	2	1	Total: 6 Média: 1,5

* Para o cálculo do sucesso de marcação, foi considerado o percentual de transmissores instalados com sucesso em relação ao número de tentativas de marcação (ou seja, foram excluídos desse cálculo apenas os transmissores que tiveram problemas no procedimento de instalação).

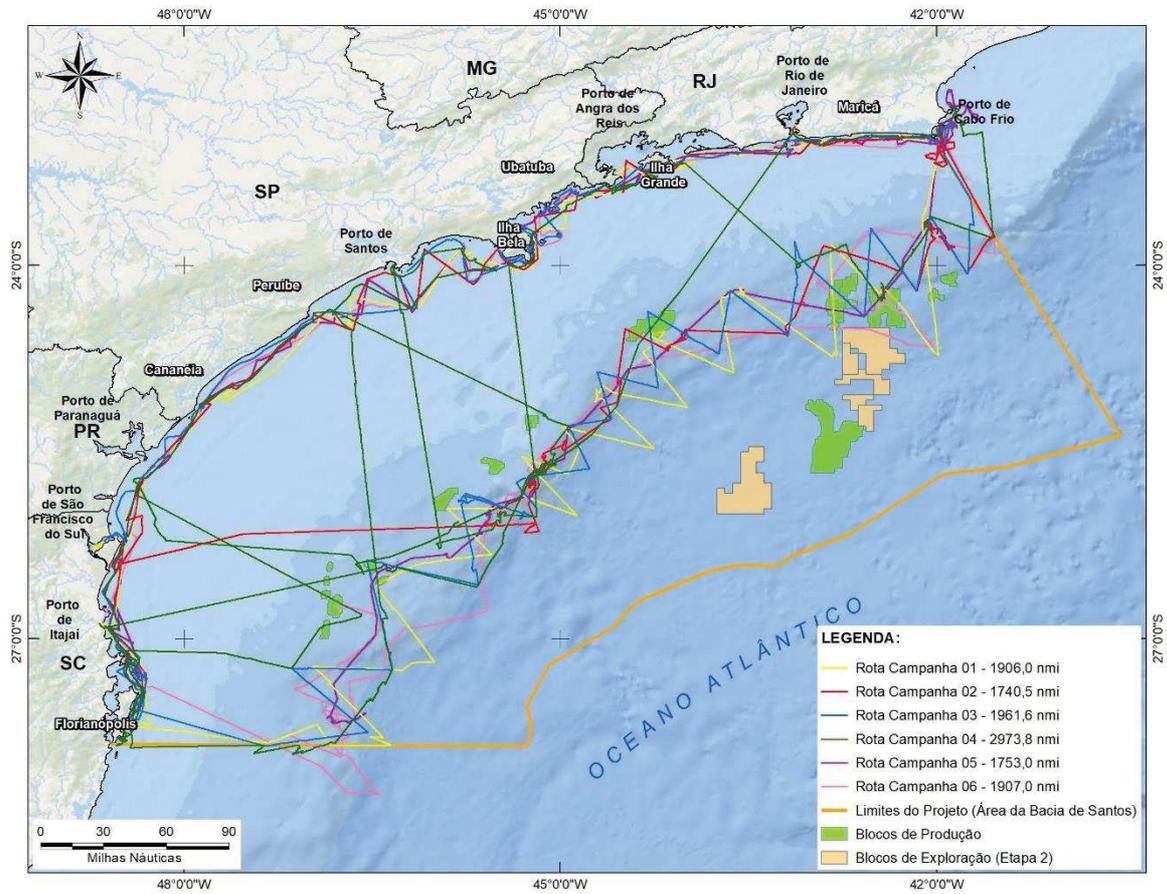


Figura IV.4-1: Rotas percorridas durante as Campanhas de Telemetria nos três anos de PMC-BS.

Tabela IV.4-2: *Espécies de cetáceos marcadas com sucesso com transmissores satelitais, usando diferentes sistemas de ancoragem, e DTAGs durante as seis Campanhas de Telemetria na Bacia de Santos. I = implantável; L = LIMPET.*

Espécie	Nome popular	Tipo de transmissor			Total
		I	L	DTAG	
Subordem Mysticeti, Família Balaenopteridae					
<i>Balaenoptera physalus</i>	Baleia-fin	0	1	1	2
<i>Balaenoptera borealis</i>	Baleia-sei	0	3	1	4
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Baleia-jubarte	6	0	5	11
<i>Balaenoptera brydei</i>	Baleia-de-bryde	0	2	2	4
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	Baleia-minke-antártica	0	1	0	1
Subordem Mysticeti, Família Balaenidae					
<i>Eubalaena australis</i>	Baleia-franca-austral	0	0	1	1
Subordem Odontoceti, Família Delphinidae					
<i>Tursiops truncatus</i>	Golfinho-nariz-de-garrafa	0	10	0	10
<i>Orcinus orca</i>	Orca	0	3	0	3
<i>Peponocephala electra</i>	Golfinho-cabeça-de-melão	0	2	1	3
Subordem Odontoceti, Família Physeteridae					
<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	1	2	1	4
TOTAL		7	24	12	44

O tempo de transmissão dos transmissores satelitais variou de 2 a 60 dias, sendo que 51,6% transmitiram por menos de 10 dias (**Tabela IV.4-3**).

Tabela IV.4-3: Duração (em dias) da coleta de dados dos transmissores satelitais implantados em cetáceos de acordo com tipo de ancoragem durante as seis Campanhas de Telemetria do PMC na Bacia de Santos.

Ancoragem	Duração (dias)			
	Mínima	Máxima	Média	Mediana
Implantável	3	60	28,0	19,0
LIMPET	2	33	10,5	7,0
Total	2	60	14,5	9,0

IV.5 Fotoidentificação

Considerando os três primeiros anos de projeto, 85.104 fotografias foram processadas, totalizando 676,6 GB de dados (Tabela IV.5-1). A Tabela IV.5-2 apresenta um acompanhamento do número total de registros utilizados por espécie e campanha, definido após a triagem inicial de fotos de melhor qualidade (qualidades A, B+ ou B-).

Tabela IV.5-1: Dados processados por ciclo e campanha do PMC na Bacia de Santos (A – Avistagem e MAP; T – Telemetria).

Ciclo	Campanha	Nº de fotografias	Volume de dados (GB)	Nº de dias trabalhados
1º	Avistagem/MAP (A1)	3.355	33,9	18 dias
	Telemetria (T1)	5.208	50,7	34 dias
	TOTAL	8.563	84,6	52 dias
2º	Avistagem/MAP (A2)	2.578	31,8	12 dias
	Telemetria (T2)	9.921	70,1	29 dias
	TOTAL	12.499	101,9	41 dias
3º	Avistagem/MAP (A3)	1.767	28,5	10 dias
	Telemetria (T3)	5.932	23,8	22 dias
	TOTAL	7.699	52,3	32 dias
4º	Avistagem/MAP	2.397	20,7	28 dias

Ciclo	Campanha	Nº de fotografias	Volume de dados (GB)	Nº de dias trabalhados
	(A4)			
	Telemetria (T4)	20.593	176,2	20 dias
	TOTAL	22.990	196,9	48 dias
5º	Avistagem/MAP (A5)	2.443	16,7	18 dias
	Telemetria (T5)	9.888	96,0	25 dias
	TOTAL	12.331	112,7	43 dias
6º	Avistagem/MAP (A6)	6.072	40,1	25 dias
	Telemetria (T6)	14.950	88,1	28 dias
	TOTAL	21.022	128,2	53 dias
Total Geral		85.104	676,6	269 dias

Tabela IV.5-2: Número de registros fotográficos utilizados para cada espécie de cetáceo por campanha do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.

Ciclo	1ª		2ª		3ª			4ª		5ª		6ª	Total
	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6	T6	
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	34	0	5	0	0	39
<i>Balaenoptera borealis</i>	0	0	8	151	12	0	0	39	129	0	0	0	339
<i>Balaenoptera brydei</i>	3	122	0	9	0	20	9	87	0	225	58	0	533
<i>Balaenoptera musculus</i>	0	0	0	0	0	0	0	83	0	0	0	0	83
<i>Balaenoptera physalus</i>	0	0	21	34	2	0	0	152	0	0	0	0	209
<i>Delphinus sp.</i>	1	14	0	16	7	0	0	0	0	169	2	0	209
<i>Feresa attenuata</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	72	0	75
<i>Globicephala sp.</i>	5	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>Grampus griseus</i>	1	0	56	170	0	0	3	108	5	17	0	148	508
<i>Lagenodelphis hosei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	99
<i>Megaptera novaengliae</i>	0	0	31	187	4	0	0	255	147	133	0	0	757
<i>Orcinus orca</i>	0	41	0	468	0	0	0	106	0	0	0	0	615
<i>Peponocephala electra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	547	176	723
<i>Physeter macrocephalus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	15	25
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Pseudorca crassidens</i>	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	25
<i>Sotalia guianensis</i>	0	307	0	6	0	4	0	0	0	34	0	0	351
<i>Stenella attenuata</i>	5	25	0	0	0	0	0	0	3	16	0	57	106
<i>Stenella clymene</i>	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	98	133

Ciclo	1ª		2ª		3ª		4ª		5ª		6ª	Total	
	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6		T6
<i>Stenella frontalis</i>	40	31	41	150	4	107	13	199	20	99	50	79	833
<i>Stenella longirostris</i>	6	22	12	15	0	11	0	0	20	207	49	224	566
<i>Steno bredanensis</i>	0	87	2	0	0	26	0	236	0	0	7	73	431
<i>Tursiops truncatus</i>	88	702	31	79	0	183	10	339	0	114	32	595	2173
Total	149	1356	202	1285	54	351	35	1702	324	1029	916	1465	8868
Taxa de registro (%)	4	26	7	13	3	6	1	8	13	10	15	9	

Ao longo dos três anos, foi possível iniciar a elaboração de catálogos de referência das 24 espécies observadas no PMC-BS, totalizando 885 indivíduos (Tabela IV.5-3). Nota-se que aproximadamente 24% dos indivíduos catalogados são de *Tursiops truncatus*, que continua dominando amplamente o banco de dados catalogados, seguido por *Stenella frontalis* com 15% do total de indivíduos catalogados.

Tabela IV.5-3: Número cumulativo de indivíduos em cada catálogo por espécie nas campanhas do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.

Ciclo	1 ^a		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a		6 ^a	
	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6	T6
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3
<i>Balaenoptera borealis</i>	0	0	0	14	15	15	15	15	17	17	17	17
<i>Balaenoptera brydei</i>	0	5	5	5	5	8	10	12	12	19	21	21
<i>Balaenoptera musculus</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4
<i>Balaenoptera physalus</i>	0	0	3	3	3	3	3	13	13	13	13	13
<i>Delphinus</i> sp.	0	3	3	4	4	4	4	4	4	21	21	21
<i>Feresa attenuata</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	8	8
<i>Globicephala</i> sp.	0	0	0	0	9	9	9	9	9	9	9	9
<i>Grampus griseus</i>	0	0	5	28	28	28	31	41	41	43	71	71
<i>Lagenodelphis hosei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14
<i>Megaptera novaengliae</i>	0	0	0	15	16	16	16	32	37	41	41	41
<i>Orcinus orca</i>	0	3	3	8	8	8	8	10	10	10	10	10
<i>Peponocephala electra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63	80
<i>Physeter macrocephalus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pseudorca crassidens</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
<i>Sotalia guianensis</i>	0	41	41	43	43	43	43	43	43	47	47	47

Ciclo	1ª		2ª		3ª		4ª		5ª		6ª	
	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6	T6
<i>Stenella attenuata</i>	0	4	4	4	4	4	4	4	5	9	9	20
<i>Stenella clymene</i>	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	9	24
<i>Stenella frontalis</i>	1	7	10	38	38	66	67	83	83	95	106	130
<i>Stenella longirostris</i>	0	4	5	6	6	7	7	7	10	40	52	108
<i>Steno bredanensis</i>	0	5	5	5	5	8	10	12	12	19	21	25
<i>Tursiops truncatus</i>	5	72	76	82	82	115	116	159	159	163	170	212
Total	6	145	161	256	267	335	345	464	474	567	714	885

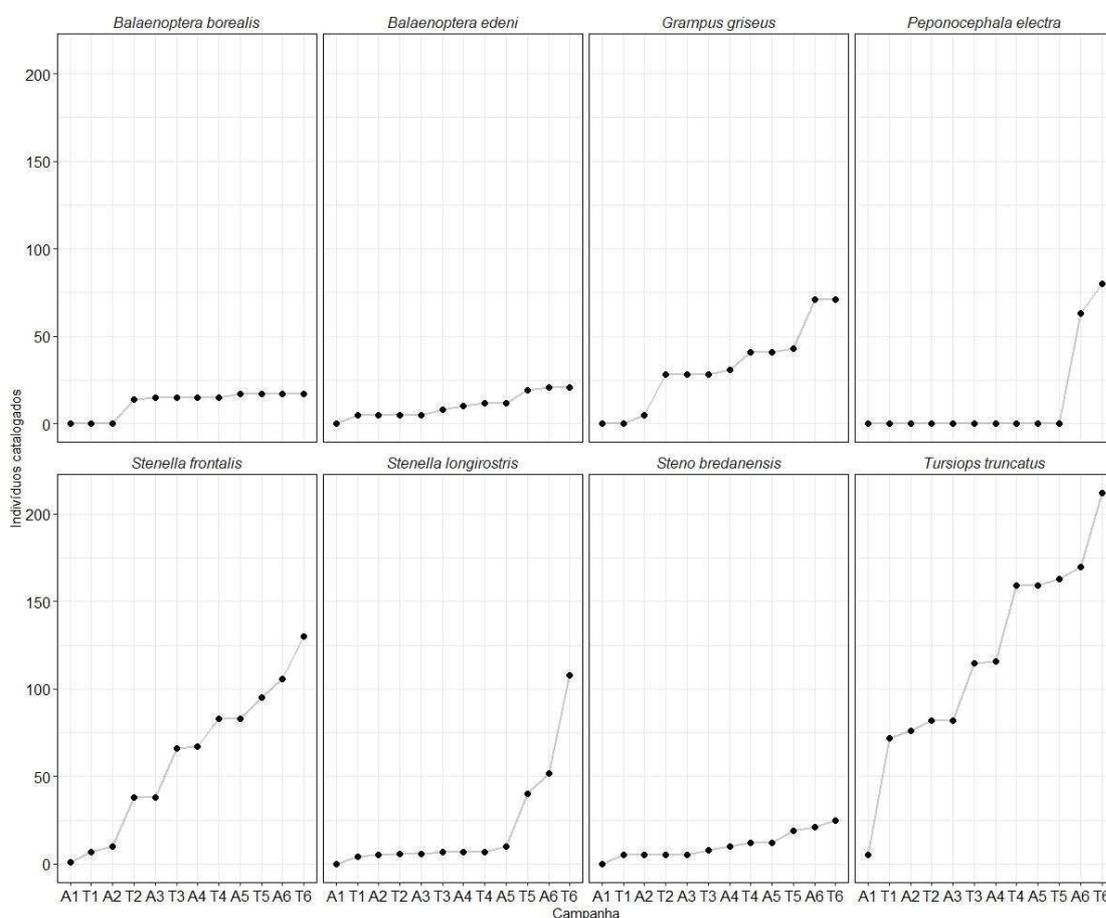


Figura IV.5-1: Acompanhamento cumulativo do crescimento dos catálogos para as espécies com mais indivíduos nas campanhas do PMC na Bacia de Santos. A = Avistagem/MAP; T = Telemetria.

O catálogo do PMC-BS foi comparado com catálogos de outros grupos de pesquisa, quais sejam: *Tursiops truncatus* (Laboratório de Mamíferos Aquáticos,

UFSC); *Tursiops truncatus* (Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, Instituto Mar Adentro); *Tursiops truncatus* (Projeto Botos da Lagoa dos Patos, FURG); *Tursiops truncatus* (Projeto de Monitoramento de Cetáceos do Talude, FURG; comparação em andamento); *Tursiops truncatus* (Instituto Baleia Jubarte; comparação em andamento); *Steno bredanensis* (Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, Instituto Mar Adentro); *Steno bredanensis* (Instituto Baleia Jubarte; comparação em andamento); *Steno bredanensis* (Laboratório de Bioacústica e Ecologia de Cetáceos, UFRRJ); *Balaenoptera brydei* (Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, Instituto Mar Adentro); *Balaenoptera brydei* (Laboratório de Bioacústica e Ecologia de Cetáceos, UFRRJ); *Megaptera novaeangliae* (Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, Instituto Mar Adentro); *Megaptera novaeangliae* (Instituto Baleia Jubarte; comparação em andamento). As fotos do catálogo de *Balaenoptera physalus* foram encaminhadas para comparação com catálogo do Hemisfério Sul da espécie (Responsável pela comparação: Dr. Luciano Dalla Rosa, FURG). As fotos dos quatro indivíduos de *Balaenoptera musculus* do PMC-BS foram encaminhadas para a comparação com o catálogo do Hemisfério Sul da espécie (Responsável pela comparação: Dra. Paula Olson, NOAA). As fotos do catálogo de *Balaenoptera borealis* foram encaminhadas para comparação com o catálogo das Ilhas Malvinas (Responsável pela comparação: Dra. Caroline Weir, Falklands Conservation).

IV.6 Coleta de biópsias

Durante os três anos de atividades do PMC-BS foram coletadas 268 amostras (257 biópsias e 11 amostras de pele solta na água) de cetáceos nas Campanhas de Avistagem Embarcada/MAP e de Telemetria (**Tabela IV.6-1**). Um total de 19 espécies de cetáceos foi amostrado com biópsias e identificadas geneticamente. *Stenella frontalis* foi a espécie mais amostrada (24,6%), seguida de *S. longirostris* (17,1%), *T. truncatus* (16,7%), *M. novaeangliae* (6,7%) e outras 15 espécies com menos de 5% do total de amostras coletadas em três anos.

As campanhas de Telemetria foram as plataformas primárias de coleta de biópsias, com 200 amostras coletadas em seis campanhas, ou quase 75% do total de amostras (**Tabela IV.6-2**).

Tabela IV.6-1: Número de amostras por espécie amostrada, após cada campanha do PMC na Bacia de Santos. A1 a A6 – Avistagem e MAP do 1º ao 6º ciclo; T1 a T6 – Telemetria do 1º ao 6º ciclo).

Espécie	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6	T6	Total
<i>Tursiops truncatus</i>	2	13	4	1	0	7	6	3	1	0	3	5	45
<i>Sotalia guianensis</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Stenella frontalis</i>	0	3	9	6	3	5	7	6	3	4	13	7	66
<i>Stenella longirostris</i>	0	5	1	2	0	11	0	0	3	7	6	11	46
<i>Stenella attenuata</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	6	12
<i>Stenella clymene</i>	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	2	7
<i>Delphinus delphis</i>	0	2	0	2	1	0	0	0	0	2	1	0	8
<i>Steno bredanensis</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	9
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Orcinus orca</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Peponocephala electra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>Physeter macrocephalus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5
<i>Balaenoptera brydei</i>	0	2	0	2	0	6	0	0	0	2	0	0	12
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5
<i>Balaenoptera borealis</i>	0	0	0	10	0	0	0	3	0	0	0	0	13
<i>Balaenoptera physalus</i>	0	0	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	6
<i>Balaenoptera musculus</i>	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6
<i>Megaptera novaeangliae</i>	0	0	0	4	0	0	0	10	0	4	0	0	18
<i>Eubalaena australis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	2	31	17	28	5	30	14	42	7	28	23	41	268

Tabela IV.6-2: Riqueza de espécies com biópsia coletada durante as campanhas embarcadas do 1º ao 6º ciclo do PMC-BS. Em parênteses é o número de amostras.

Campanha	Espécies Mistictetos	Espécies Odontocetos	Espécies Total	Total Biópsias
Avistagem e MAP 1	0	1 (2)	1	2
Telemetria 1	1 (2)	7 (29)	8	31
Avistagem e MAP 2	2 (2)	4 (15)	6	17
Telemetria 2	4 (17)	4 (11)	8	28
Avistagem e MAP 3	0	3 (5)	3	5
Telemetria 3	1 (6)	4 (24)	5	30
Avistagem e MAP 4	0	3 (14)	3	14
Telemetria 4	7 (28)	4 (14)	11	42
Avistagem e MAP 5	0	3 (7)	3	7
Telemetria 5	2 (6)	5 (22)	7	28
Avistagem e MAP 6	0	4 (23)	4	23
Telemetria 6	0	7 (41)	7	41
Total Geral				268

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO ORIENTADA PARA OS OBJETIVOS

V.1 Comunidade de cetáceos

V.1.1 Composição e estrutura da comunidade de cetáceos

Nenhum método de amostragem de cetáceos é perfeito e todos apresentam algum tipo de viés na detecção e identificação das espécies. No Relatório do Ano 2 do PMC-BS, as quatro plataformas de coleta de dados usadas no projeto, que podem fornecer informações para descrever a comunidade de cetáceos, foram comparadas quanto ao sucesso na identificação taxonômica (PETROBRAS, 2017): Campanhas de Avistagem Embarcada, Monitoramento Acústico Passivo (MAP), Campanhas de Avistagem Aérea e Campanhas de Telemetria.

Foi demonstrado que os métodos visuais embarcados (Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanha de Telemetria) fornecem os dados mais acurados sobre as espécies que ocorrem na Bacia de Santos. Foi possível identificar 86% das detecções em nível de gênero ou espécie nas Campanhas de Telemetria, enquanto que esse percentual de identificação foi de 56% nas Campanhas de Avistagem Embarcada. Portanto, para a descrição da composição e da estrutura das comunidades de cetáceos da Bacia de Santos, utilizaram-se os dados embarcados coletados por essas duas plataformas. Visando complementar os métodos visuais, especialmente para gêneros de difícil identificação, como *Globicephala* e *Delphinus*, foram usadas ainda as identificações genéticas (ver item **IV.1.2 Identificação Molecular das Espécies**).

Composição e estrutura da comunidade de cetáceos da Bacia de Santos

Um total de 25 espécies, distribuídas em cinco famílias (Eubalaenidae, Balaenopteridae, Physeteridae, Delphinidae e Pontoporiidae), foi identificado com métodos visuais em combinação com métodos genéticos nos três anos de PMC na Bacia de Santos (**Tabela V.1-1**). As famílias com maior riqueza registrada foram: Delphinidae, com 15 espécies observadas e Balaenopteridae, com sete espécies. Considerando-se ainda os registros acústicos, é possível incluir pelo menos mais duas famílias (Ziphiidae e Kogiidae), porém sem identificação das espécies.

Mais de dois terços das espécies observadas na Bacia de Santos em três anos de PMC demandam alguma atenção no que concerne à sua conservação. Um total de 32% das espécies está classificado com algum grau de ameaça de extinção (categorias “ criticamente Ameaçada”, “Em Perigo” ou “Vulnerável”) pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2018). Outras 36% são classificadas como “Deficiente em Dados”, ou seja, sofrem algum tipo de ameaça antropogênica, mas não existem informações que possam determinar seu *status* de conservação.

Curvas cumulativas do número de espécies em função do esforço amostral em dias de campo na Bacia de Santos mostraram uma boa amostragem da comunidade de cetáceos (**Figura V.1-1**). Para gerar as curvas, os dados foram aleatorizados e intervalos de confiança foram estimados. As curvas analisadas separadamente por tipo de campanha ou combinando-se as Campanhas de Avistagem Embarcada e de Telemetria mostraram que o número de espécies tendeu a se estabilizar entre 50 e 100 dias de esforço.

Tabela V.1-1: Espécies identificadas em três anos de atividade do PMC-BS. Status de conservação conforme a Portaria do MMA nº 444/2014 e, quando não consta na lista nacional, conforme IUCN (2018). CR = Criticamente em Perigo; EM = Em Perigo; VU = Vulnerável; QA = Quase Ameaçada; BR = Baixo Risco; DD = Deficiente em Dados.

Subordem	Família	Espécie/Gênero	Nome popular	Abreviação	Status
Mysticeti	<i>Balaenidae</i>	<i>Eubalaena australis</i>	Baleia-franca-austral	Eubalaena	EM
	<i>Balaenopteridae</i>	<i>Balaenoptera musculus</i>	Baleia-azul	B_musculus	CR
		<i>Balaenoptera physalus</i>	Baleia-fin	B_physalus	EM
		<i>Balaenoptera borealis</i>	Baleia-sei	B_borealis	EM
		<i>Balaenoptera brydei</i>	Baleia-de-Bryde	B_brydei	DD
		<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	Baleia-minke-Antártica	B_bona	QA
		<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Baleia-minke-anã	B_acuto	BR
	<i>Megaptera novaenagliae</i>	Baleia-jubarte	M_novaeangliae	VU	
Odontoceti	<i>Physeteridae</i>	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	Physeter	VU
	<i>Delphinidae</i>	<i>Orcinus orca</i>	Orca	Orca	DD
		<i>Pseudorca crassidens</i>	Falsa-orca	Pseudo	DD
		<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Baleia-piloto-de-peitorais-curtas	Glob_mac	DD
		<i>Feresa attenuata</i>	Orca-pigméia	Feresa	DD
		<i>Peponocephala electra</i>	Golfinho-cabeça-de-melão	Pepono	BR
		<i>Grampus griséus</i>	Golfinho-de-Risso	Grampus	DD
		<i>Sotalia guianensis</i>	Boto-cinza	Sotalia	VU
		<i>Steno bredanensis</i>	Golfinho-de-dentes-rugosos	Steno	BR
		<i>Tursiops truncatus</i>	Golfinho-nariz-de-garrafa	Tursiops	BR
<i>Stenella attenuata</i>	Golfinho-pintado-neotropical	Ste_att	BR		

Subordem	Família	Espécie/Gênero	Nome popular	Abreviação	Status
		<i>Stenella frontalis</i>	Golfinho-pintado-do-Atlântico	Ste_fron	DD
		<i>Stenella longirostris</i>	Golfinho-rotador	Ste_long	DD
		<i>Stenella clymene</i>	Golfinho-de-Clymene	Ste_cly	DD
		<i>Delphinus delphis</i>	Golfinho-comum	Delphis	BR
		<i>Lagenodelphis hosei</i>	Golfinho-de-Fraser	Lageno	BR
	<i>Pontoporiidae</i>	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Toninha	Pontoporia	CR

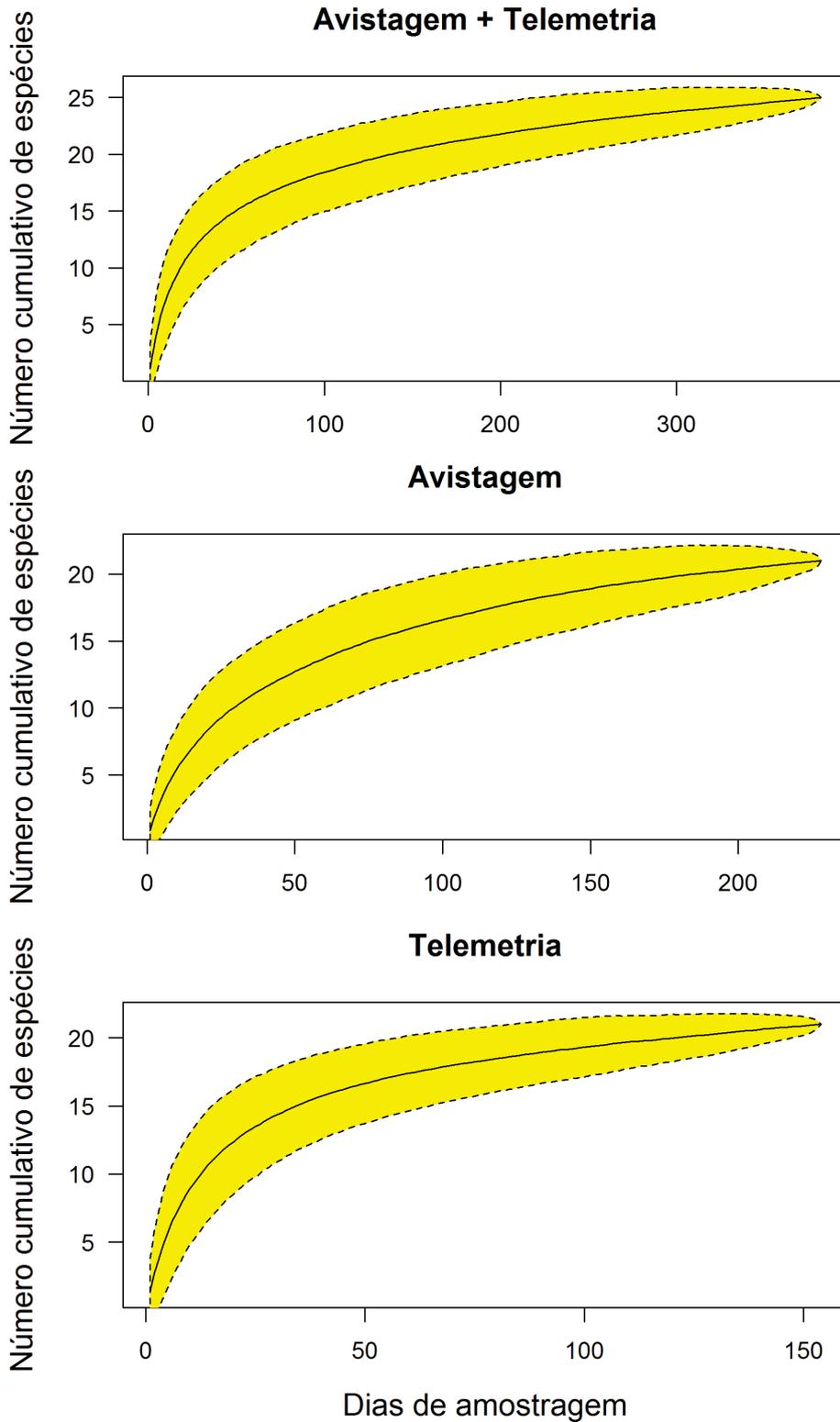


Figura V.1-1: Número cumulativo de espécies em função dos dias amostrados nas Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanhas de Telemetria do PMC na Bacia de Santos.

Considerando as Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanhas de Telemetria combinadas, quatro espécies mais comuns corresponderam a 62% do total de grupos detectados em três anos (**Figura V.1-2**): baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* – 21,5%), golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis* – 19,7%), baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei* – 10,6%) e golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus* – 10,6%). Um total de 11 espécies foi considerado raro ou pouco frequente por possuir quatro ou menos registros cada ao longo dos três anos. Elas perfizeram 4,1% do total de registros de cetáceos nos dois tipos de campanha considerados nesta análise.

Nas Campanhas de Avistagem Embarcada, foram observadas 21 espécies. A espécie mais frequente nesse tipo de campanha foi o golfinho-pintado-do-Atlântico, seguido da baleia-jubarte e do golfinho-nariz-de-garrafa (**Figura V.1-3**). Nas Campanhas de Telemetria, também foram observadas 21 espécies, sendo a baleia-jubarte a mais frequente, seguida da baleia-de-Bryde, golfinho-nariz-de-garrafa e golfinho-pintado-do-Atlântico (**Figura V.1-4**).

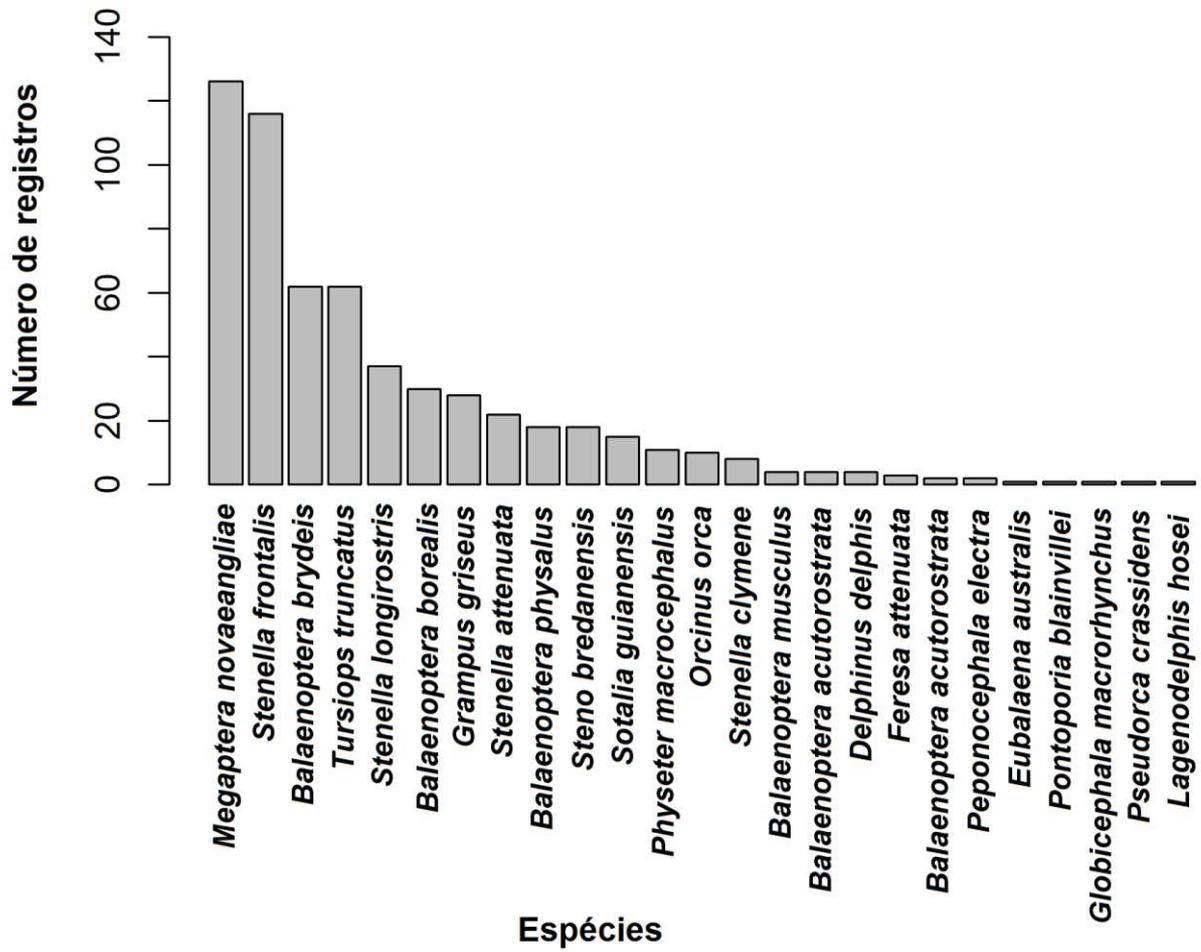


Figura V.1-2: *Frequência de registros por espécies em Campanhas de Avistagem Embarcada e Campanhas de Telemetria em três anos de PMC da Bacia de Santos.*

CAMPANHAS DE AVISTAGEM EMBARCADA

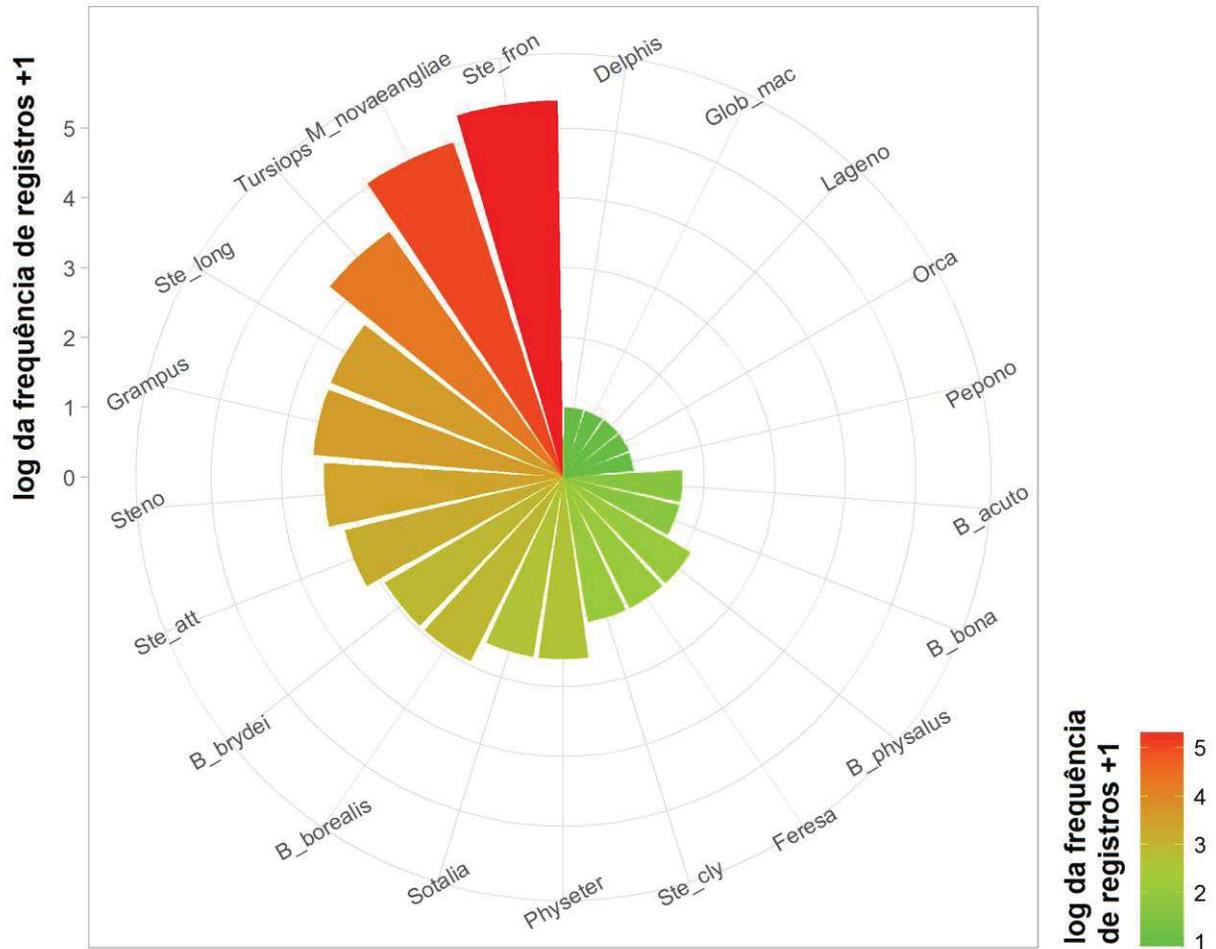


Figura V.1-3: *Frequência de registros por espécie (na escala log+1) em Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos de PMC da Bacia de Santos. Abreviação das espécies na Tabela IV.1-1.*

CAMPANHAS DE TELEMETRIA

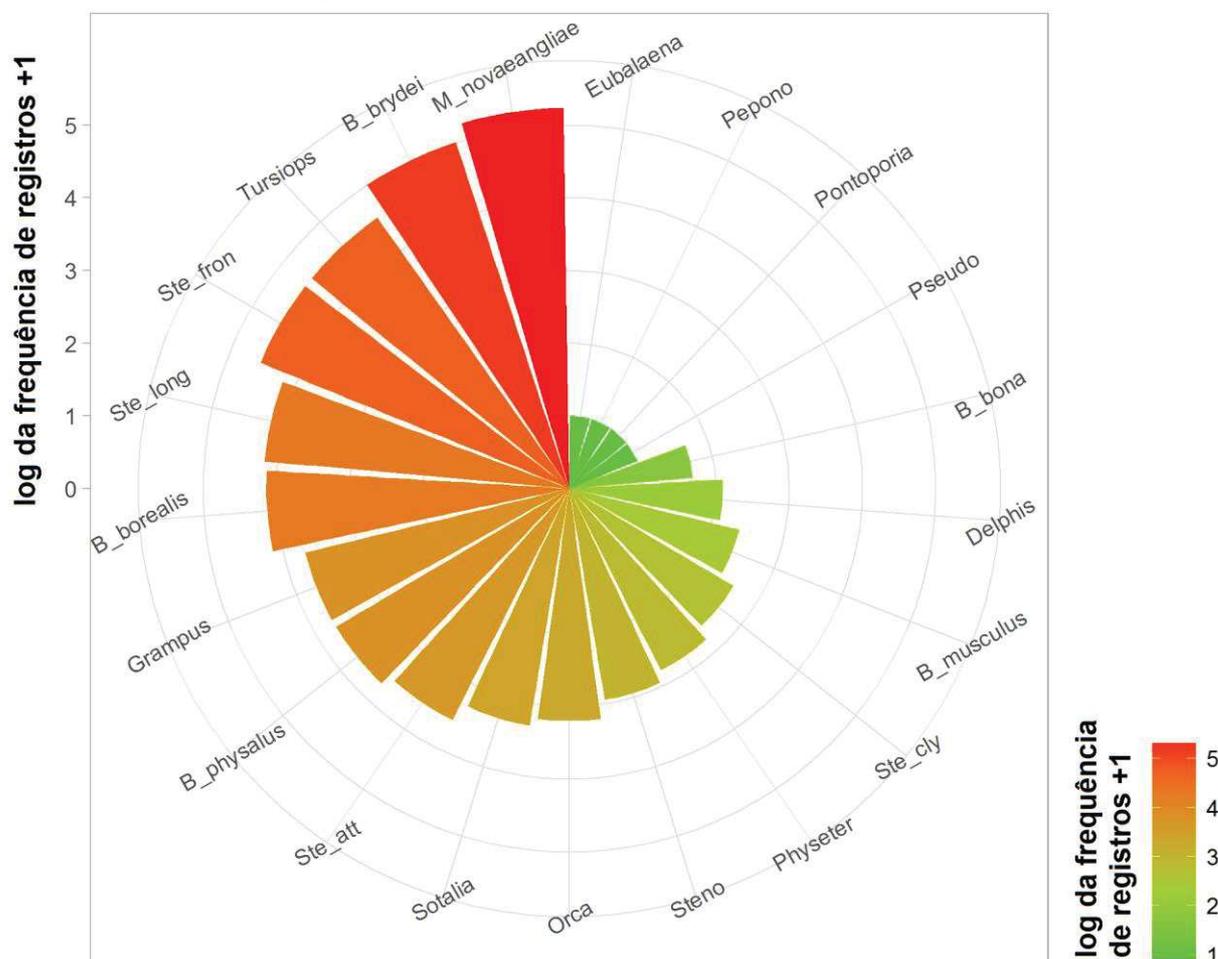


Figura V.1-4: Frequência de registros por espécie (na escala $\log+1$) em Campanhas de Telemetria em três anos de PMC da Bacia de Santos. Abreviação das espécies na Tabela IV.1-1.

Discussão sobre comunidade de cetáceos

As duas plataformas que se baseiam em reconhecimento visual de cetáceos por meio de campanhas embarcadas (Avistagem e Telemetria) foram eficientes em amostrar a maior parte da riqueza de cetáceos esperada para a Bacia de Santos. Esta suficiência amostral é evidente quando se plotam as curvas cumulativas do número de espécies por esforço de campo, que tendem a estabilizar entre 50 e 100 dias de campo. Apesar disso, a curva ainda é

ascendente, o que sugere que ainda não foram amostradas todas as espécies presentes na comunidade.

Algumas espécies esquivas ou de difícil visualização não foram detectadas ou foram observadas em pouquíssimas ocasiões pelos métodos visuais em campanhas embarcadas. Nesses casos, a combinação de técnicas acústicas e visuais pode ajudar a fornecer uma descrição mais completa da comunidade de cetáceos. O MAP foi a metodologia com menor sucesso na identificação taxonômica, mas as detecções de animais da Família Ziphiidae só foram registradas acusticamente. Outro exemplo é a Família Kogiidae, que foi detectada visualmente uma única vez durante uma Campanha de Telemetria, enquanto indivíduos ou grupos da família foram detectados acusticamente diversas vezes.

As Campanhas de Avistagem Aérea, por sua vez, também apresentaram baixa eficiência na identificação de gêneros e espécies. Entretanto, essa plataforma foi a que mais registrou grupos de toninhas (*Pontoporia blainvillei*). As detecções de cachalotes, uma das poucas espécies que atualmente pode ser identificada acusticamente, também foram bem mais frequentes durante o MAP. Conforme demonstrado anteriormente no Relatório Anual do PMC (PETROBRAS, 2017), os resultados reforçam uma complementariedade das técnicas utilizadas no âmbito do PMC-BS para descrever a composição da comunidade.

Gêneros de difícil identificação visual, como *Globicephala* e *Delphinus*, só foram identificados em nível específico por meio da genética. Desta maneira, em virtude da coleta de material genético ter sido feita para somente uma pequena parcela dos grupos, certamente a frequência destas espécies está subestimada na descrição da estrutura da comunidade de cetáceos.

Comparando as frequências de observação de diferentes espécies entre as Campanhas de Telemetria e de Avistagem Embarcada, percebe-se que existem diferenças importantes na frequência e na composição dos cetáceos detectados por essas amostragens. A diferença decorre principalmente das diferentes rotas percorridas pelas campanhas, que são sistemáticas para as Campanhas de Avistagem Embarcada, e se concentraram na região costeira e

no talude continental nas Campanhas de Telemetria.

Um total de 25 espécies foi registrado em três anos de PMC, correspondendo a 65,8% da riqueza esperada para a Bacia de Santos, de 38 espécies (PETROBRAS, 2015). Foram registradas duas espécies novas em relação aos dois primeiros anos do PMC-BS: o golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*) e o golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*).

O Volume II deste relatório (**Guia de identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos**) traz a descrição de cada uma das espécies, uma síntese sobre o conhecimento das mesmas no Brasil, um resumo sobre a sua ocorrência na Bacia de Santos e diversas outras informações.

Do ponto de vista da gestão e conservação dos cetáceos, chama a atenção o fato de que aproximadamente um terço das espécies é classificado com algum grau de ameaça de extinção. Dentre essas espécies ameaçadas, estão as três maiores baleias de barbatana (Subordem Mysticeti), sendo elas a baleia-azul, a baleia-fin e a baleia-sei. Também cabe destacar que pouco mais de um terço das espécies sofrem ameaças, mas não há dados que permitam acessar seu *status* de conservação, portanto, foram classificadas como “Deficiente em Dados”. Assim, grande parte dos dados apresentados aqui é inédita e eles serão de extrema importância para incrementar o conhecimento sobre os cetáceos da Bacia de Santos.

V.1.2 Identificação Molecular das Espécies

Algumas espécies de cetáceos apresentam diferenças morfológicas sutis e difíceis de identificar em campo. A genética molecular tem sido uma ferramenta importante para auxiliar na identificação acurada das espécies de cetáceos de difícil identificação visual, bem como para resolver as incertezas taxonômicas de algumas espécies e/ou subespécies. Todas as amostras coletadas durante os três anos do PMC-BS foram identificadas molecularmente por intermédio do sequenciamento e das análises da região controle do DNA mitocondrial (DNAMt).

As sequências (*forward* e *reverse*) da região controle do DNAm_t, geradas para cada uma das amostras, foram alinhadas, ajustadas manualmente, e as posições variáveis confirmadas visualmente por meio dos cromatogramas usando o programa SEQUENCHER 5.4.6 (*Gene Codes Corporation*). Após a geração da sequência consenso das leituras *forward* e *reverse* obtidas para cada amostra, as espécies foram identificadas. Para essa finalidade, cada sequência da região controle do DNAm_t de cada amostra foi comparada, utilizando o programa *DNA Surveillance* (ROSS et al., 2003), com as sequências do banco de dados de referência, versão 4.3, "*Witness for the Whale*" e **Mysticetes** para baleias, **Delphinidae + Stenoninae** para delfinídeos e **Globicephalinae + Orcininae** para as espécies *Globicephala sp.*, *Orcinus orca* e *Peponocephala electra*. Este é o sistema mais usado internacionalmente para identificação molecular com dados de DNAm_t de cetáceos por ser um sistema com curadoria especializada.

Adicionalmente, as sequências também foram comparadas com o banco de sequências de DNA do GenBank, por pesquisas de similaridade usando a ferramenta BLAST desse banco, em que se verifica a espécie com maior similaridade. Porém, nem todas as espécies possuem sequências de referência no GenBank. Assim, nos casos de discrepância na identificação entre os resultados do *DNA Surveillance* e a espécie mais próxima no GenBank, a identificação oriunda do primeiro foi a opção escolhida.

Das 268 amostras coletadas nas campanhas de Avistagem Embarcada e MAP, e de Telemetria durante os três anos do PMC-BS, 266 (99,2%) apresentaram sequências de boa qualidade e foram identificadas molecularmente como pertencentes a 19 espécies (sete mysticetos e 12 odontocetos) de cetáceos. Adicionalmente, três amostras de baleia-jubarte (GM1 a GM3) foram coletadas na costa norte de Santa Catarina fora das campanhas e apresentaram sequências de boa qualidade e tiveram a identificação da espécie (*Megaptera novaeangliae*) confirmada. Estas amostras foram coletadas durante o monitoramento oportunístico de uma baleia-jubarte marcada com transmissor satelital na região.

O **Anexo IV.1.2-1** apresenta a identificação e o sexo de todas as 269

amostras analisadas (n = 266 biópsias coletadas em campanha + três amostras de baleia-jubarte coletadas oportunisticamente na costa norte de Santa Catarina).

Todas as sequências obtidas das amostras identificadas em campo, como golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), boto-cinza (*Sotalia guianensis*), golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*), orca (*Orcinus orca*), golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), cachalote (*Physeter macrocephalus*), baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*), baleia-minke-Antártica (*Balaenoptera bonaerensis*), baleia-fin (*B. physalus*), e baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) agruparam com alto suporte (acima de 85%) com as sequências de referência para cada espécie (*bottlenose*, *tucuxi*, *rough-toothed*, *killer whale*, *melon-headed whale*, *pygmy sperm whale*, *humpback*, *Antarctic minke*, *fin* e *southern right*) no DNA Surveillance (p. ex., **Figura V.1-5**). Essas sequências também apresentaram maior similaridade com as sequências das respectivas espécies no GenBank.

Com relação às sequências obtidas para as amostras identificadas em campo como espécies do gênero *Stenella*, houve dois casos de aparente erro de identificação. Um indivíduo (amostra G21), identificado como golfinho-rotador (*S. longirostris*) em campo, foi classificado geneticamente como golfinho-pintado-pantropical (*S. attenuata*) (**Figura V.1-6**). Essa identificação errônea pode ser explicada pela presença das duas espécies no mesmo grupo formado por centenas de indivíduos.

O outro caso foi um indivíduo (amostra G35) identificado como golfinho-pintado-pantropical (*S. attenuata*) em campo, que foi classificado geneticamente como golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) (**Figura V.1-7**), provavelmente porque o grupo era formado por indivíduos imaturos, dificultando a identificação em campo. As sequências obtidas das outras amostras de *S. attenuata* e *S. longirostris* foram agrupadas com alto suporte (acima de 80%) às sequências de referência do golfinho-pintado-pantropical (*Pantropical spotted*) e golfinho-rotador (*spinner*) no DNA Surveillance, e apresentaram maior similaridade com as sequências das respectivas espécies no GenBank.

Apesar das sequências obtidas das amostras de golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) terem apresentado maior similaridade com sequências de *Delphinus capensis* ou *D. delphis* no GenBank, a identificação da espécie foi confirmada pelo *DNA Surveillance* que agrupou com alto suporte cada sequência às sequências de referência de *S. frontalis* (*Atlantic spotted*). Da mesma forma, embora as sequências obtidas das amostras de golfinho-Clymene (*S. clymene*) terem apresentado maior similaridade com sequências de *S. coeruleoalba* e *D. delphis* no GenBank, todas agruparam com alto suporte (acima de 70%) às sequências de referência da espécie (*Clymene*) no *DNA Surveillance*.

Já as sequências obtidas de amostras identificadas em campo como golfinho-comum (*Delphinus sp.*) foram agrupadas com alto suporte (acima de 70%) às de referência do golfinho-comum-de-bico-curto (*short-beaked*) (**Figura V.1-8**). Adicionalmente, essas sequências apresentaram maior similaridade com as sequências de *D. delphis* no GenBank, confirmando a identidade de uma espécie de difícil identificação visual.

Outra espécie de difícil identificação visual é a baleia-piloto (*Globicephala sp.*) e a sequência da única amostra coletada em campo foi agrupada com alto suporte (acima de 80%) às sequências de referência da baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*short-finned pilot whale*) no *DNA Surveillance* (**Figura V.1-9**) e apresentou maior similaridade com as sequências de *G. macrorhynchus* no GenBank.

Com relação às amostras dos indivíduos identificados em campo como baleia-sei (*B. borealis*), houve dois casos de erro de identificação, sendo que as sequências das amostras G67 e G68 foram classificadas geneticamente como baleia-de-Bryde (*B. brydei*) (**Figura V.1-10**), tanto pelo *DNA Surveillance* quanto pelo GenBank. Essa identificação errônea pode ser explicada pela similaridade entre as duas espécies e como o grupo era grande, formado por 11 indivíduos, as duas espécies estavam misturadas no mesmo grupo. As sequências das outras amostras de baleia-sei apresentaram maior similaridade com as sequências de *B. borealis* e foram agrupadas com alto suporte (acima de 99%) às de referência da espécie (*sei whale*) (**Figura V.1-10**).

Um merecido destaque deve ser dado às cinco amostras coletadas dos indivíduos identificados em campo como baleia-azul (*B. musculus*). No Hemisfério Sul, duas diferentes subespécies são reconhecidas, a baleia-azul-pigméia (*B. musculus brevicauda*), e a baleia-azul-verdadeira ou Antártica (*B. musculus intermedia*) (LEDUC et al., 2007). As sequências dessas baleias amostradas na Bacia de Santos foram agrupadas com alto suporte (acima de 97%) com as de referência de *B. musculus (blue whale)* e apresentaram maior similaridade com as sequências de *B. musculus* no GenBank. Porém, ambos os sistemas de identificação molecular não foram capazes de identificar a subespécie. Assim, para comparar com as sequências referência publicadas dessas subespécies (LEDUC et al., 2007; SREMBBA et al., 2012; TORRES-FLOREZ et al., 2014), o alinhamento foi encurtado para 410 pares de bases. Posteriormente, as sequências das amostras G139 e G160 colapsaram em haplótipos (EU093939 e JN801066) encontrados nas baleias-azuis que ocorrem na Antártica (LEDUC et al., 2007; SREMBBA et al., 2012) sugerindo que esses animais são da subespécie *B. musculus intermedia*.

Finalmente, as sequências obtidas de 10 amostras identificadas em campo como baleia-de-Bryde (*B. edeni*), espécie que possui complexa taxonomia mas era comumente usada pela comunidade científica, foram agrupadas com alto suporte (98%) com as de referência de *B. brydei (Bryde's common)* e apresentaram maior similaridade com as sequências de *B. brydei* no GenBank, reforçando a ocorrência dessa espécie no Brasil, como já apresentado em um estudo genético que identificou oito amostras de baleia-de-Bryde como *B. brydei* (PASTENE et al., 2015).

No entanto, houve um erro de identificação para um grupo formado por uma fêmea com filhote e um adulto, que foram identificados em campo como baleia-de-Bryde (amostras G137 e G138), mas foram identificadas molecularmente como baleia-minke-Antártica (*B. bonaerensis*), tanto pelo *DNA Surveillance (Figura V.1-10)* quanto pelo BLAST no GenBank. Inclusive, uma delas (G137) apresentou um haplótipo com 5 sítios únicos, diferenciando-o daqueles encontrados nos outros 4 indivíduos de baleia-minke-Antártica amostrados até o momento. Além disso, o indivíduo da amostra G138, que foi

tagueado com LIMPET (ver Movimentos **Item IV.4**), apresentou um deslocamento em linha reta para as regiões oceânicas do Nordeste, área de reprodução conhecida para as minke no Brasil, corroborando com a identificação genética. Este erro de identificação foi devido à avistagem de uma baleia-de-Bryde alguns minutos antes e à presença de diversos grupos de balaenopterídeos na região. Durante a descida dos botes, os grupos se misturaram e causaram a confusão dos observadores, sendo posteriormente resolvido com a identificação genética.

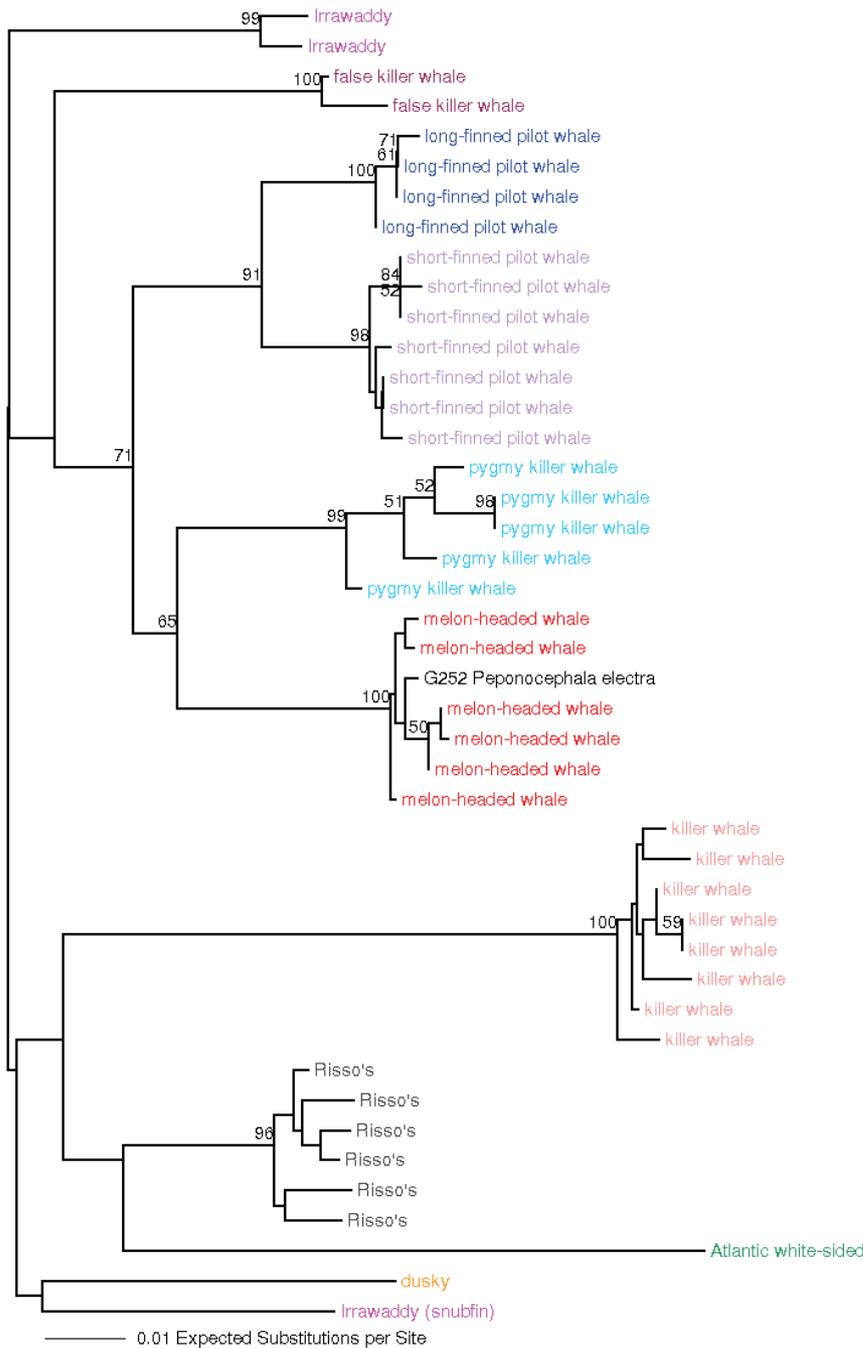


Figura V.1-5: *Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G252 (identificada como G252 Peponocephala electra) e nas sequências referência da região controle do DNAm das espécies das subfamílias Globicephalinae e Orcininae.*

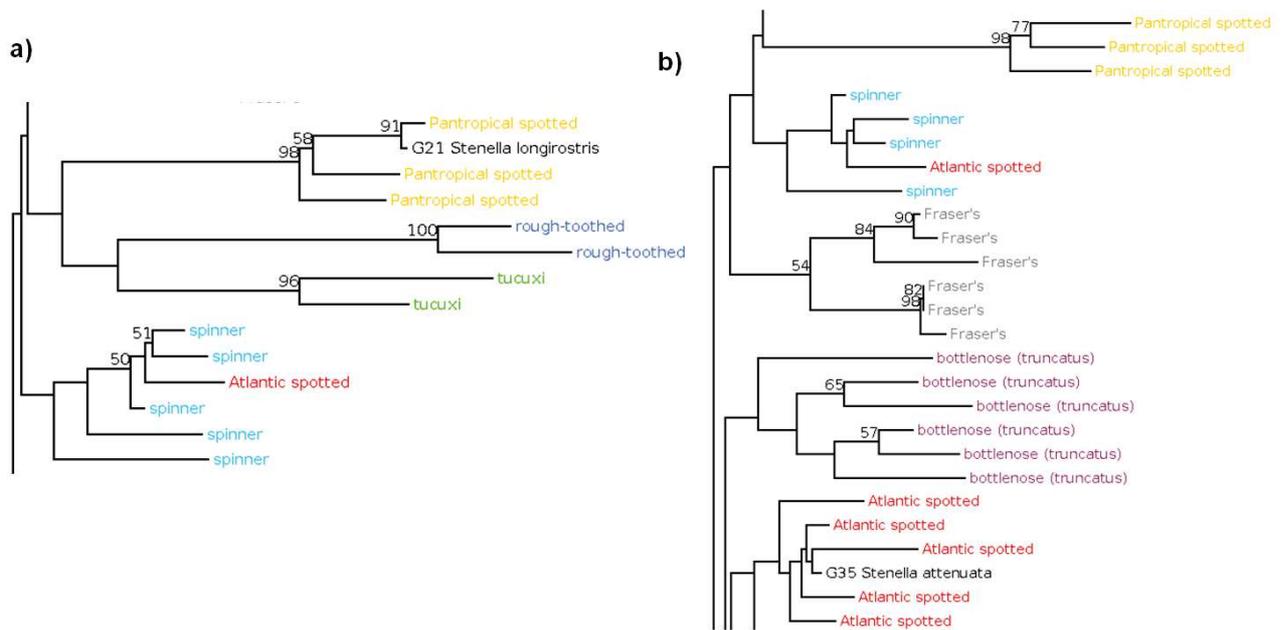


Figura V.1-6: Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas seqüências das amostras G21 (a) e G35 (b) (identificadas respectivamente como G21 *Stenella longirostris* e G35 *Stenella attenuata*) e nas seqüências referência da região controle do DNAm de todos os delfínídeos (a figura não apresenta todas as espécies).

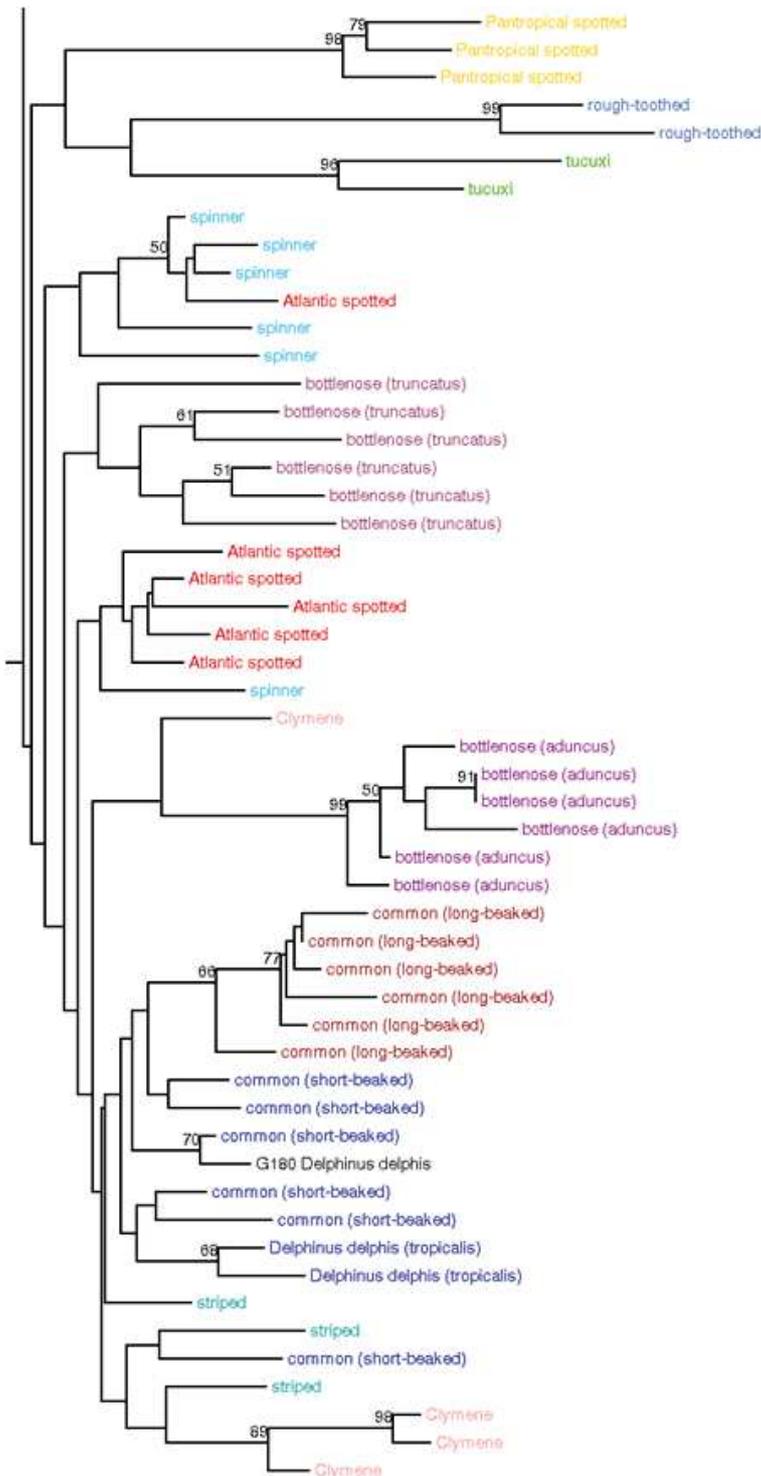


Figura V.1-7: *Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G180 (a) (identificada como G180 Delphinus delphis) e nas sequências referência da região controle do DNAmT de todos os delfínidos (a figura não apresenta todas as espécies).*

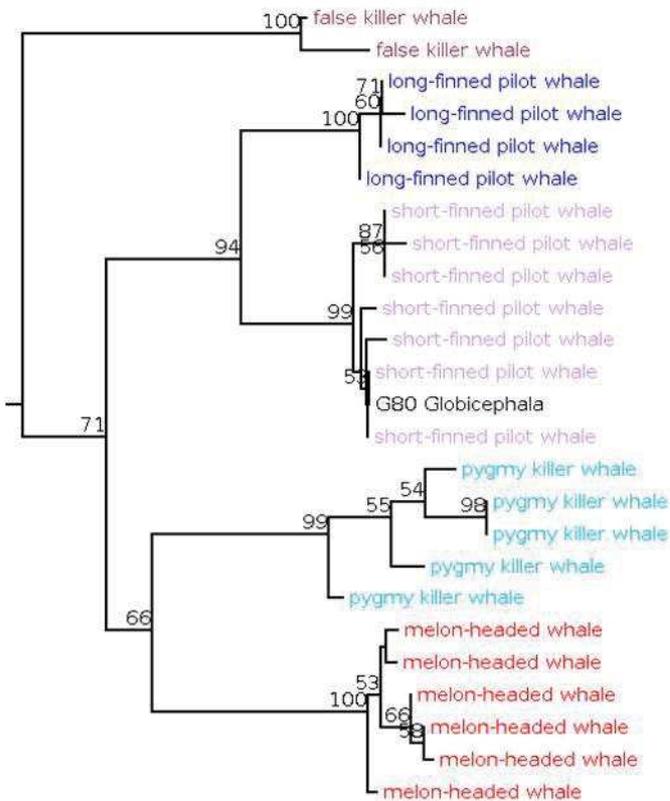


Figura V.1-8: *Árvore filogenética gerada no DNA Surveillance, baseada na sequência da amostra G80 (identificada como G80 Globicephala) e nas sequências referência da região controle do DNAm das espécies das subfamílias Globicephalinae e Orcininae.*

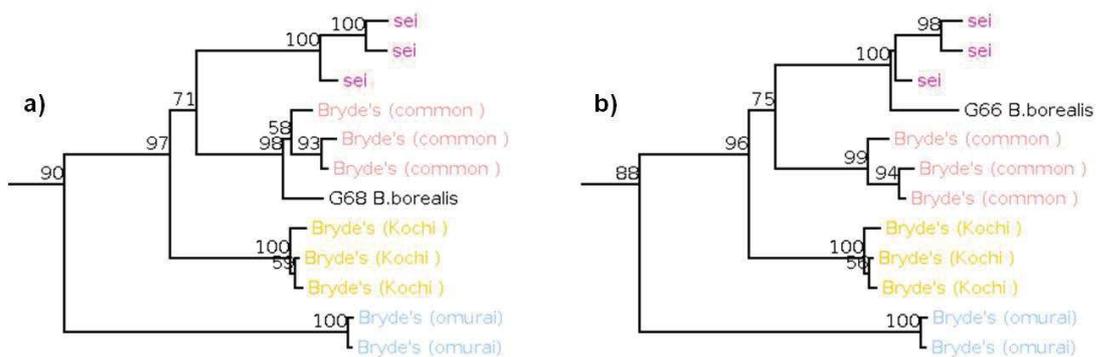


Figura V.1-9: *Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas sequências das amostras G68 (a) e G66 (b) (identificadas respectivamente como G68 e G66 B. borealis) e nas sequências referência da região controle do DNAm de todos os misticetos (a figura não apresenta todas as espécies). Valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas.*

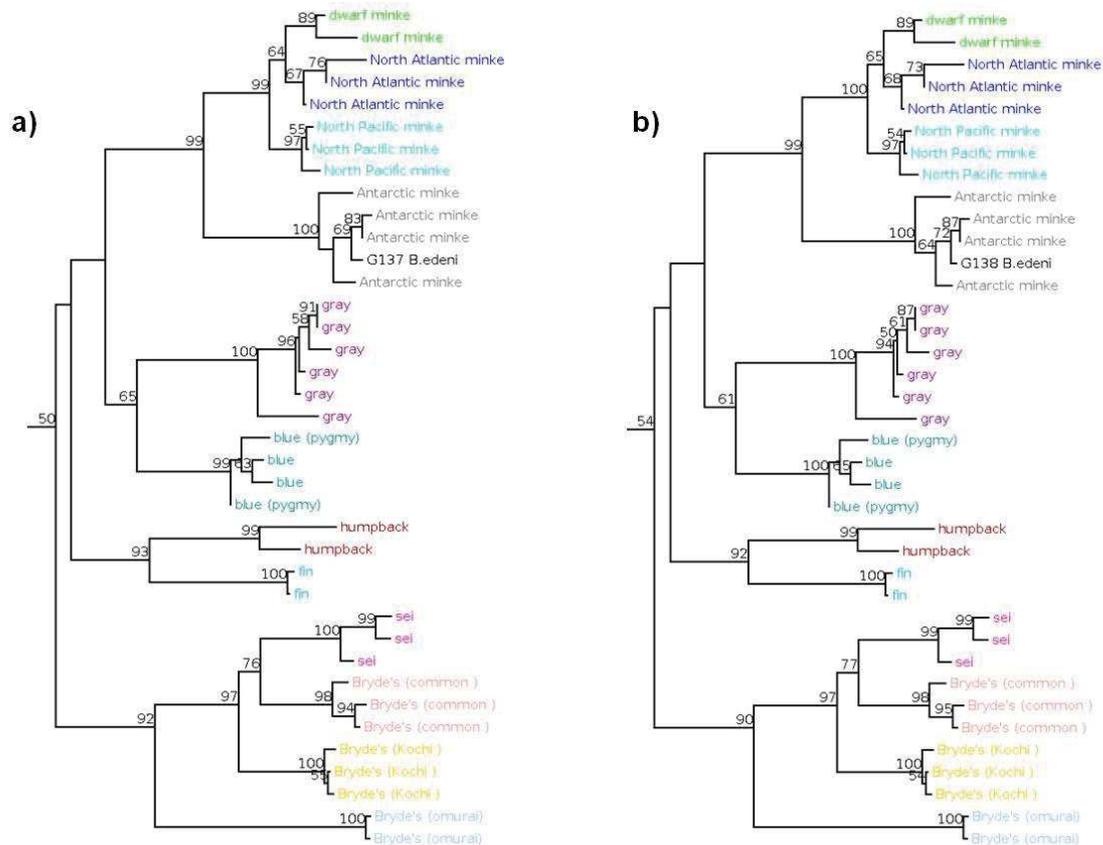


Figura V.1-10: Árvores filogenéticas geradas no DNA Surveillance, baseadas nas sequências das amostras G137 (a) e G138 (b) (identificadas respectivamente como G137 e G138 *B. edeni*) e nas sequências referência da região controle do DNAm_t de todos os mysticetos (a figura não apresenta todas as espécies).

No total, 19 espécies de cetáceos foram identificadas molecularmente durante os três anos do PMC-BS, permitindo elucidar a identificação de duas espécies (*Delphinus delphis* e *Globicephala macrorhynchus*) de difícil identificação visual, e de uma espécie (*Balaenoptera brydei*) e de uma subespécie (*B. musculus intermedia*) com taxonomia complexa. Além disso, a identificação molecular possibilitou o reconhecimento de casos de erro na identificação visual para quatro espécies (*Stenella longirostris*, *S. attenuata*, *B. borealis* e *B. brydei*) que foram identificadas geneticamente como *S. attenuata*, *S. frontalis*, *B. brydei* e *B. bonaerensis*, respectivamente.

V.2 Distribuição, movimentos e uso de habitat

V.2.1 Distribuição dos cetáceos e Modelagem de habitat com inclusão de variáveis antrópicas

A distribuição dos cetáceos (e suas presas) pode responder a variáveis estáticas (e.g., batimetria) e/ou dinâmicas que oscilam em diferentes escalas temporais e espaciais (e.g., temperatura, clorofila). Algumas variáveis têm a capacidade de influenciar a distribuição dos cetáceos. São elas: ambientais, oceanográficas, bióticas e antrópicas.

Aprofundando o esforço para entender os fatores que governam a distribuição dos cetáceos na Bacia de Santos e se ela é afetada por atividades humanas, este item procurou descrever a distribuição dos cetáceos e modelar a variação espacial no número de detecções de misticetos e odontocetos na Bacia de Santos. A modelagem estatística foi uma ferramenta importante para a análise desses dados, pois permite descrever, explicar e gerar previsões sobre a abundância relativa de cetáceos nos quadrantes em função de fatores ambientais e humanos.

Distribuição de cetáceos

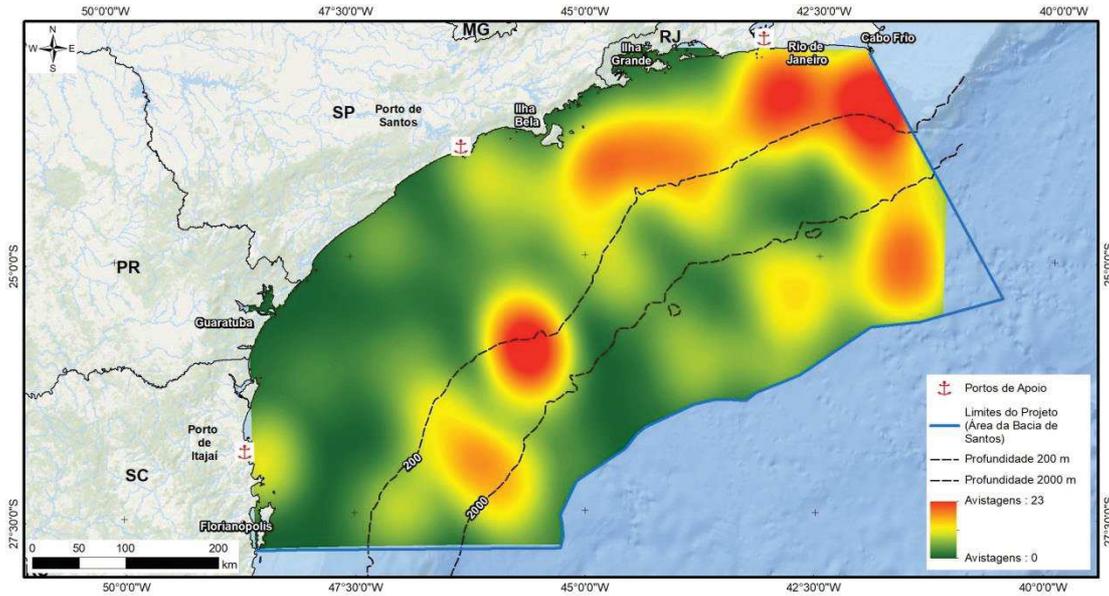
A distribuição refere-se à ocorrência e arranjo espacial de um grupo em uma área definida e em um determinado período. A distribuição foi investigada por meio da densidade de Kernel (Worton, 1989), que é um método não paramétrico que se ajusta à distribuição de pontos, evidenciando regiões de concentração (alta densidade de registros). Os mapas de densidade Kernel podem apresentar regiões nas extremidades com ausência de estimativa de densidade. Este artefato do método decorre da interpolação ser realizada dentro dos limites dos registros realizados, não significando que a região sem estimativas de densidade não foi amostrada.

A distribuição tanto de misticetos quanto odontocetos foi heterogênea na Bacia de Santos, sendo possível identificar diferentes regiões de concentração

(Figura V.2-1 a Figura V.2-3). As regiões de mysticetos apresentaram variações entre os métodos utilizados. Nas Campanhas de Avistagem Embarcada, duas áreas principais de concentração foram identificadas ao longo dos três anos de estudo: uma região ao norte da área de estudo, abrangendo as adjacências de Cabo Frio, desde regiões costeiras até oceânicas; e uma região no talude continental ao largo do litoral dos estados do Paraná e Santa Catarina. Apesar de a coleta pelo MAP ter sido simultânea, somente uma região adjacente a Cabo Frio foi identificada como de alta densidade de mysticetos. Essa concentração foi de grupos da baleia-jubarte, pois esta é a única espécie de mysticeto que pode ser detectada acusticamente. Este viés ocorre porque o canto dos machos em áreas reprodutivas atinge frequências maiores que não são mascaradas pelo ruído da embarcação de pesquisa, enquanto os sons de todos os outros mysticetos são de baixa frequência. Nos sobrevoos, além da região ao norte da área de estudo ter sido evidenciada como de alta densidade de mysticetos, também foi identificada uma área de concentração mais costeira na região sul do Estado de São Paulo.

Para os odontocetos, tanto as detecções visuais quanto acústicas em Campanhas Embarcadas evidenciaram diversos pontos de concentração ao longo do talude da Bacia de Santos. Os registros visuais em Campanhas de Avistagem Embarcada também mostram duas áreas de alta densidade na plataforma continental na região da foz do complexo de Paranaguá, Estado do Paraná, e na região de Peruíbe, Estado de São Paulo. Além das regiões citadas, os sobrevoos identificaram também a região de Ilhabela como área de alta densidade de odontocetos.

Misticetos



Odontocetos

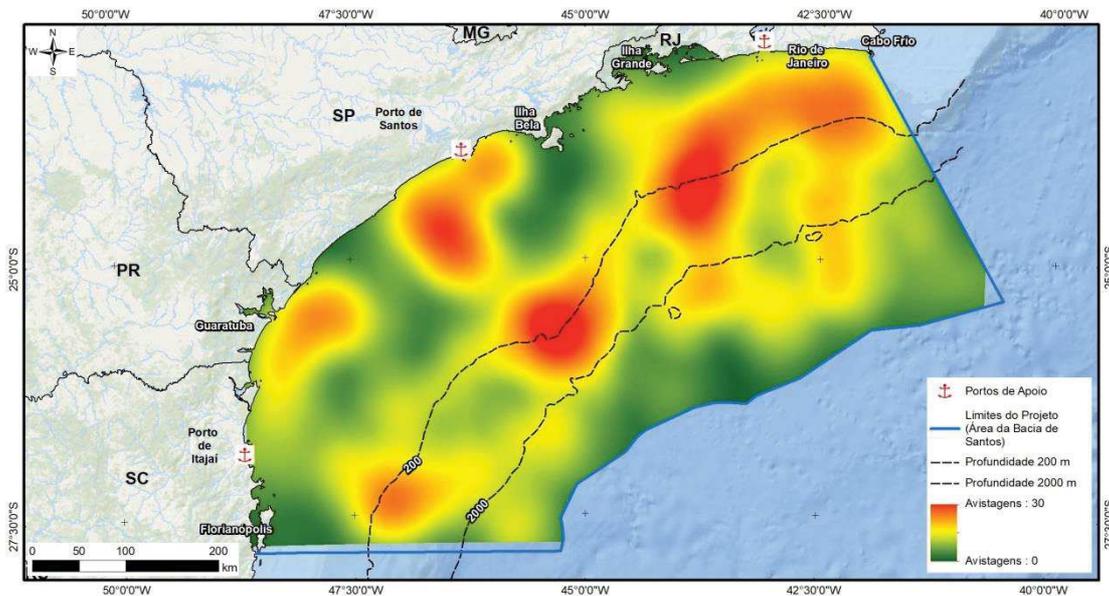
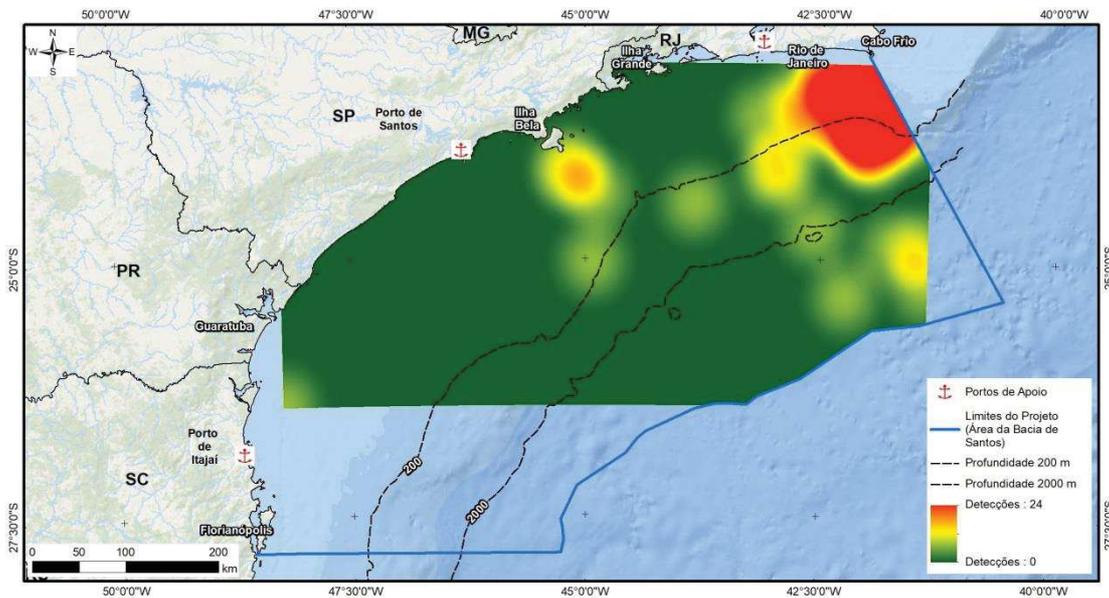


Figura V.2-1: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos misticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados visualmente durante as Campanhas de Avistagem Embarcada nos três anos de PMC na Bacia de Santos.

Misticetos



Odontocetos

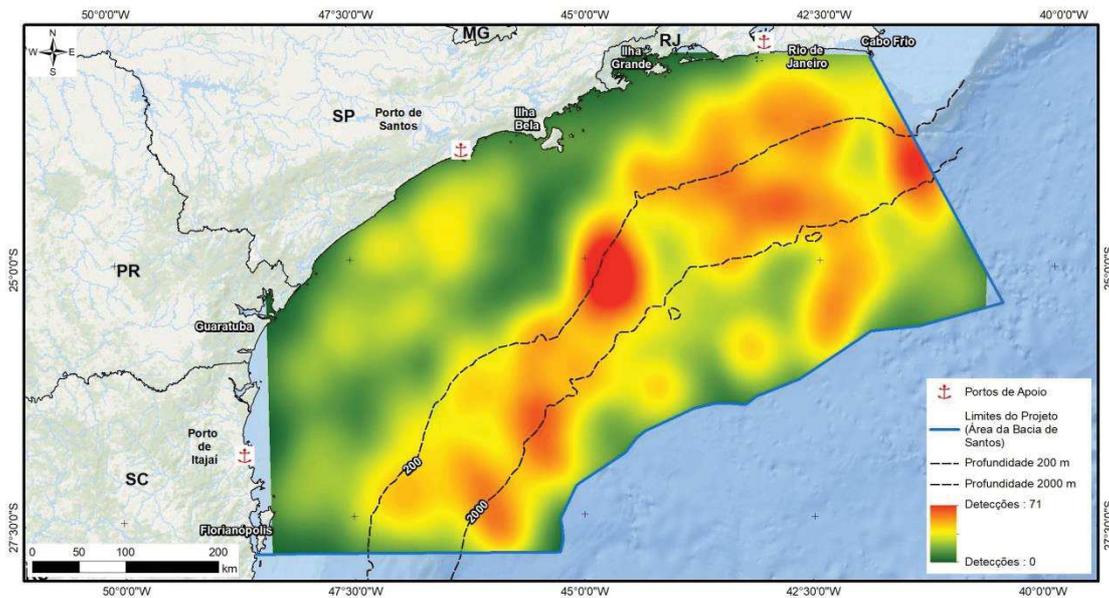
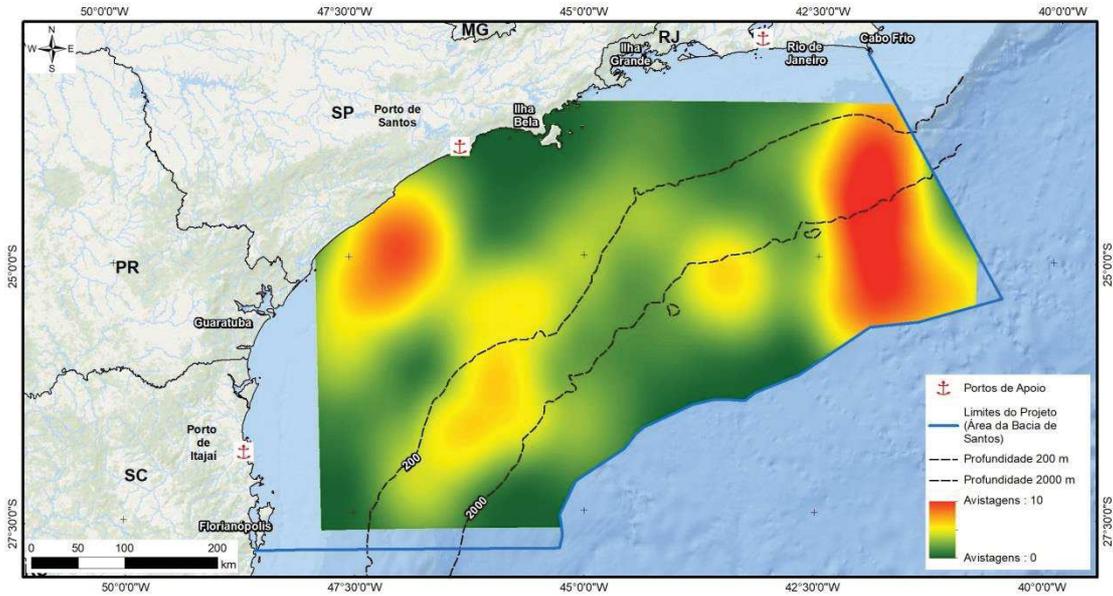


Figura V.2-2: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos misticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados acusticamente durante as Campanhas de Monitoramento Acústico Passivo (MAP) nos três anos de PMC na Bacia de Santos.

Misticetos



Odontocetos

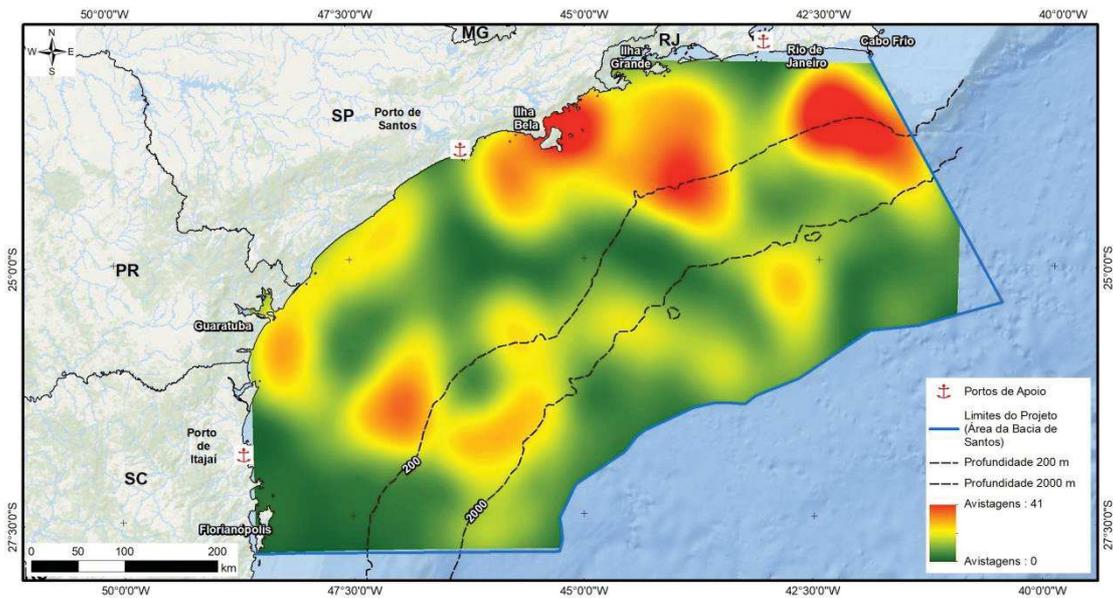


Figura V.2-3: Áreas de concentração (pelo método de densidade Kernel) de cetáceos misticetos (superior) e odontocetos (inferior) detectados visualmente durante as Campanhas de Avistagem Aérea nos três anos de PMC na Bacia de Santos.

Avaliando a distribuição de cetáceos em cada campanha separadamente com a aplicação do método de densidade Kernel, é possível notar que existe uma variabilidade na distribuição dos animais entre as campanhas (**Figura V.2-4 a Figura V.2-6**).

Algumas áreas de concentração são recorrentes ao longo das campanhas, inclusive diversos setores do talude continental e da região norte da Bacia de Santos, próxima de Cabo Frio. No entanto, outras áreas de alta densidade são efêmeras, como algumas regiões próximas da costa e algumas áreas oceânicas. Essas regiões aparecem em determinadas campanhas, podendo estar relacionadas a fatores sazonais.

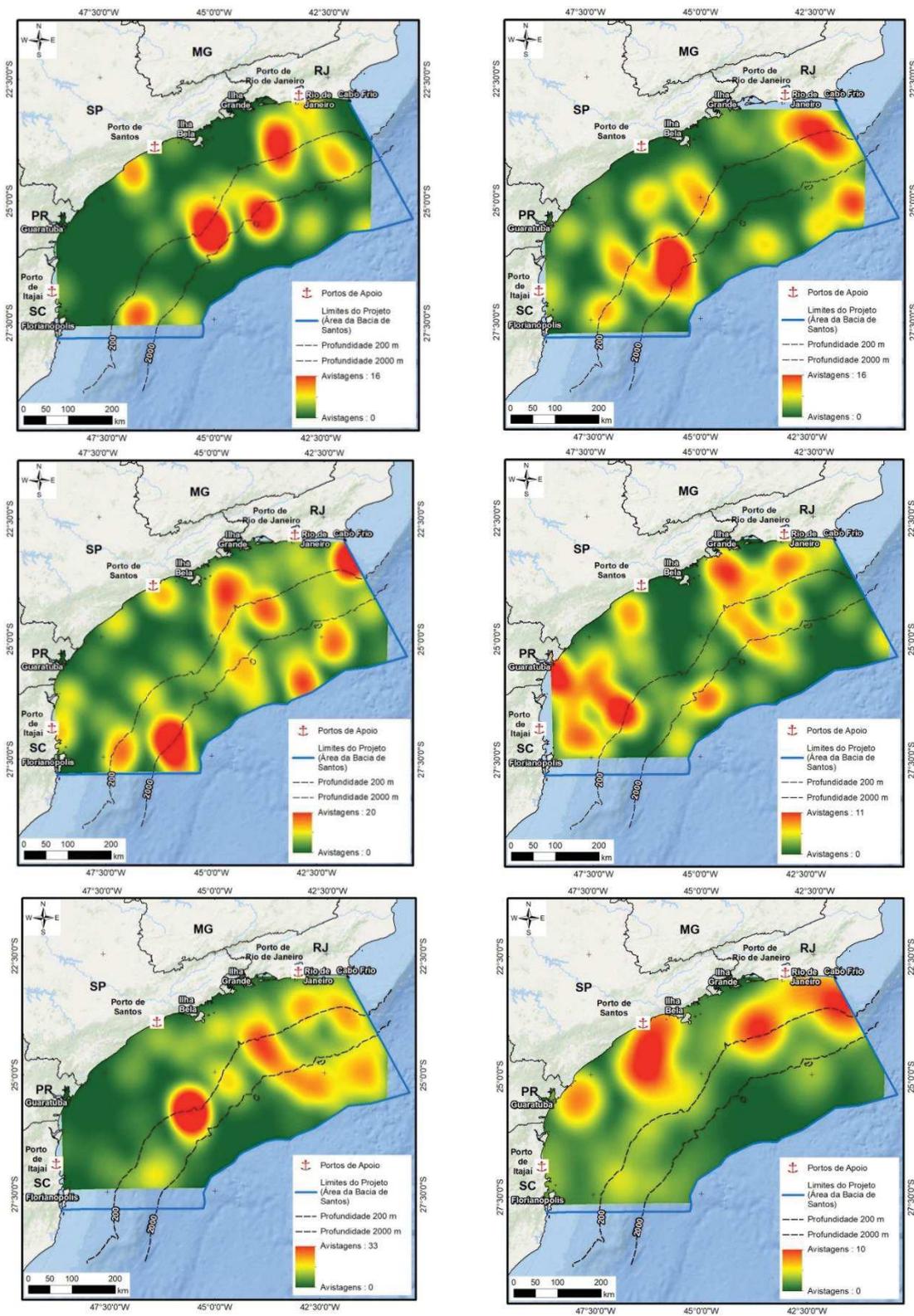


Figura V.2-4: Áreas de concentração de cetáceos detectados visualmente nas Campanhas de Avistagem Embarcada nos três anos de PMC na Baía de Santos.

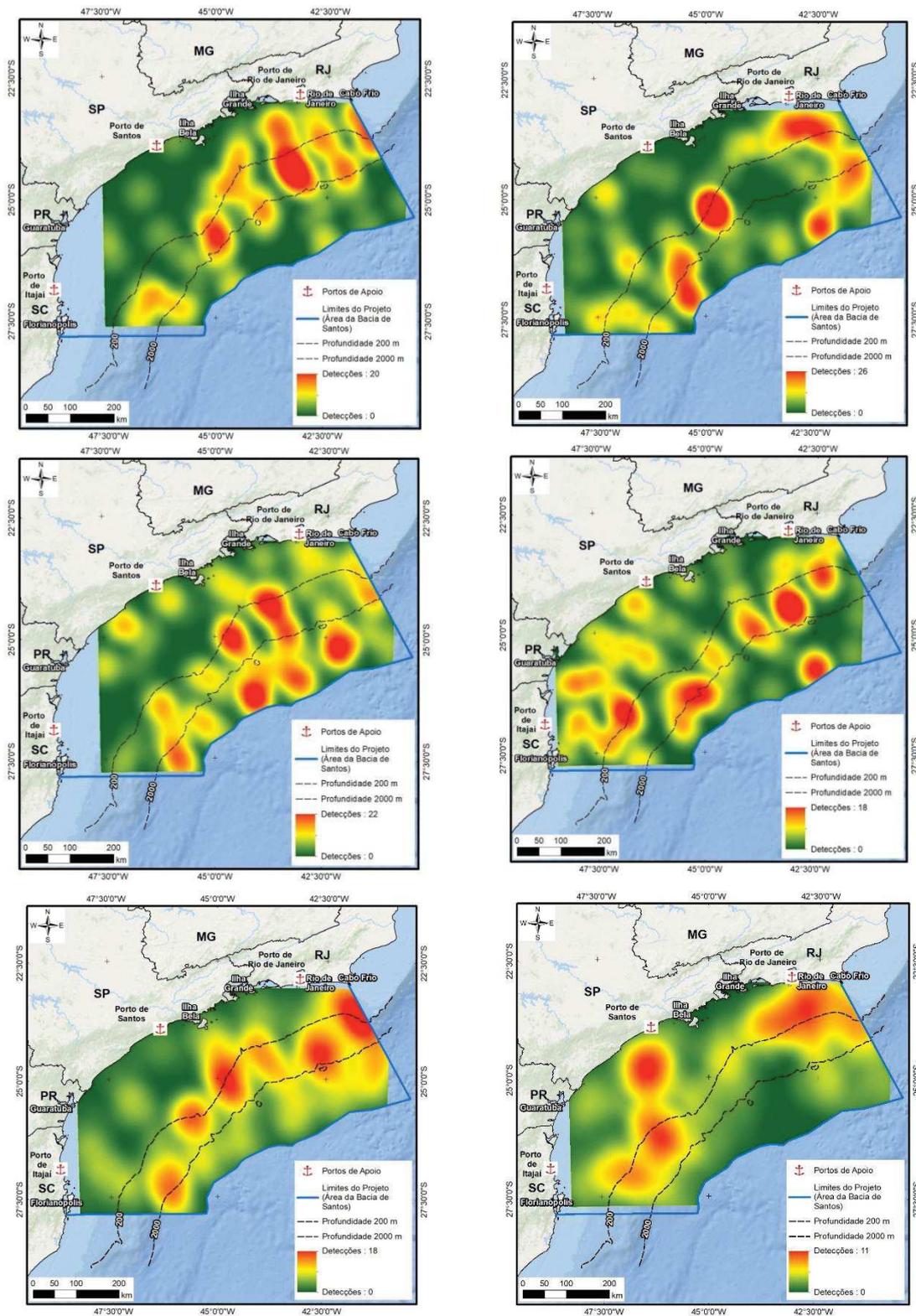


Figura V.2-5: Áreas de concentração de cetáceos detectados acusticamente nas Campanhas de MAP nos três anos de PMC na Bacia de Santos.

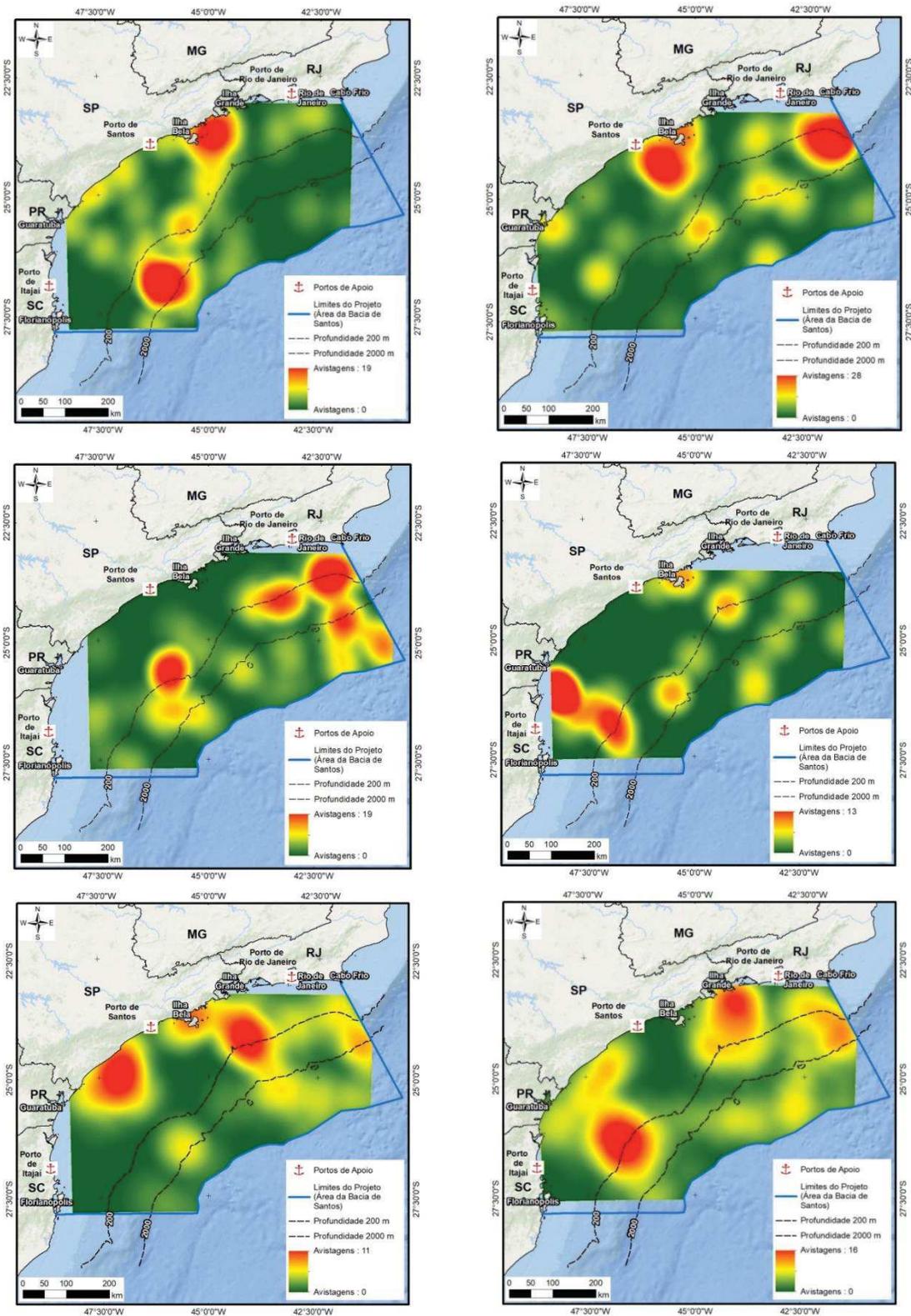


Figura V.2-6: Áreas de concentração de cetáceos detectados visualmente nas Campanhas de Avistagem Aérea nos três anos de PMC na Bacia de Santos.

Variáveis ambientais e antrópicas

Para as análises, utilizou-se um *grid* com 902 quadrantes de aproximadamente 16 km de largura, que correspondem à unidade amostral da modelagem de habitat. Os quadrantes foram caracterizados de acordo com diversas variáveis ambientais e antrópicas. São elas:

- **BATIMETRIA:** Os dados Batimétricos foram obtidos do *General Bathymetric Chart of the Oceans* (GEBCO)¹, que corresponde ao modelo de Elevação do fundo dos oceanos (**Figura V.2-7**). O conjunto de dados GEBCO inclui modelos mundiais que estão disponíveis para *download* em uma grade global de intervalo de 30 segundos (2014) e 1 minuto (2008).

Os dados batimétricos seguiram o formato raster, possibilitando o processamento em ambiente SIG, permitindo, assim, a construção de modelos hipsométricos e clinográficos (**Figura V.2-8**) do assoalho oceânico na área do projeto e no seu entorno.

¹ http://www.gebco.net/data_and_products/gridded_bathymetry_data/

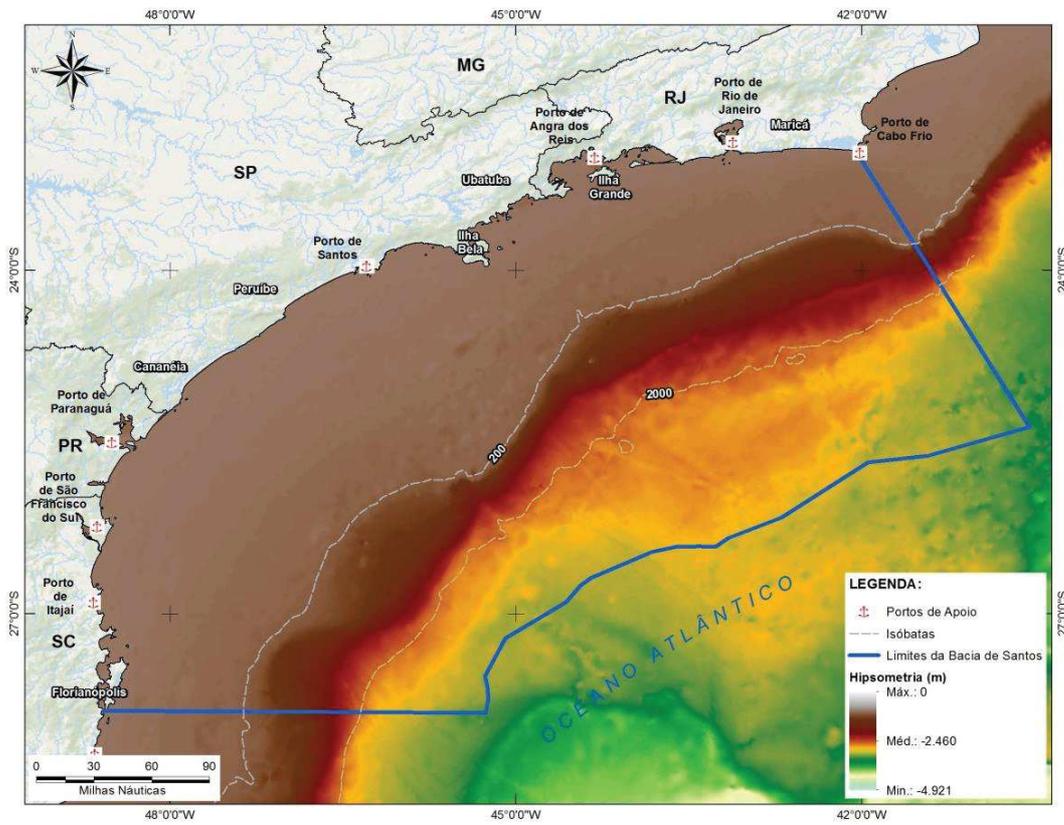


Figura V.2-7: Batimetria (em metros) da Bacia de Santos.

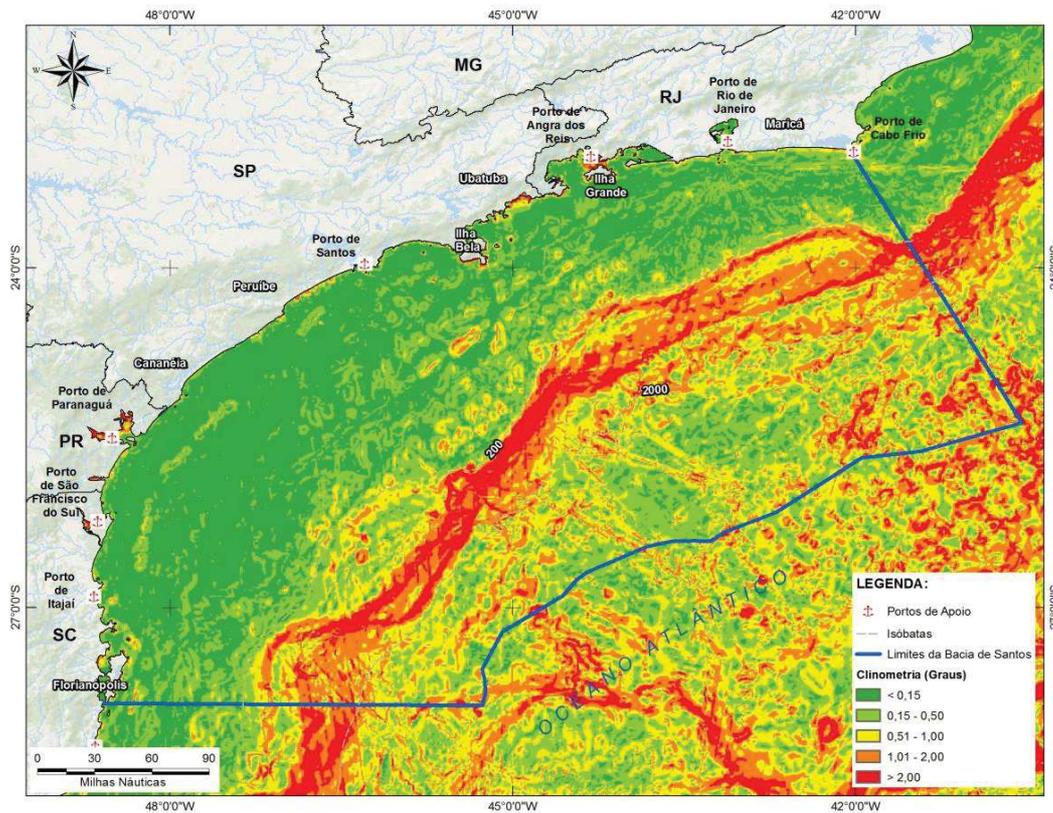


Figura V.2-8: Declividade (em graus) da Bacia de Santos.

- **TEMPERATURA:** Os dados de temperatura da superfície do mar (SST) incluíram duas fontes distintas com informações geradas diariamente (Figura V.2-9). A primeira corresponde aos dados coletados entre 27 de novembro de 2015² até 11 de outubro de 2016³, obtidos da base operacional pela Rede de Modelagem e Observação Oceanográfica (REMO) do Laboratório de Meteorologia Aplicada da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LMA / UFRJ)⁴.

A coleta dos dados realizada pela REMO emprega a técnica de interpolação ótima de Barnes (OI) em uma grade regional de 0,05 graus usando dados avançados de radiômetro de alta resolução (AVHRR) da série de satélites da Administração Oceânica e Atmosférica Nacional (NOAA) e dados

² Início das campanhas do PMC.

³ Último dia do processamento dos dados SST pela REMO.

⁴ Disponível em: <https://podaac.jpl.nasa.gov/dataset/REMO_OI_SST_5km-UFRJ-L4-SAMERICA-v1.0>

de micro-ondas (TMI) da Missão de Medição Tropical Rainfall (TRMM), que é uma missão conjunta entre a NASA e a Agência Japonesa de Exploração Aeroespacial (JAXA) para gerar produtos de SST sem costura (com infravermelho e micro-ondas) de 0,05 graus de diâmetro (aproximadamente 5,5 km).

Os dados disponibilizados pela REMO situam-se entre as latitudes 45°S e 15°N e as longitudes 70°W e a região de 15°W (que recobrem grande trecho da costa brasileira) e são totalmente validados por medições *in situ* auxiliadas por onze boias meteoceanográficas de previsão posicionadas na região tropical do Oceano Atlântico (PIRATA – *Prediction and Research Moored Array in the Tropical Atlantic*).

O outro conjunto de dados satelitais de temperatura da superfície do oceano foi adquirido do Instituto Meteorológico Dinamarquês (DMI)⁵, que também usa uma abordagem de optimal interpolation (OI), em uma grade de 0,05 graus, recobrando, entretanto, todo o globo. Nesse conjunto de dados, a análise se baseia na observação do sensor GHRSSST L2P e as observações SBS secundárias de vários satélites. Os sensores utilizados para aquisição dos dados incluem o Radiometer Advanced Very High Resolution (AVHRR), o Spinning Enhanced Visible e Infrared Imager (SEVIRI), o Advanced Microwave Scanning Radiometer 2 (AMSR2), o Visible Infrared Imager Radiometer Suite (VIIRS) e o Spectroradiometer de Imagem de Resolução Moderada (MODIS) no AQUA. Este conjunto de dados adere à versão 2 GHRSSST Data Processing Specification (GDS).

Os dados adquiridos do Instituto Meteorológico Dinamarquês (DMI) correspondem aos dados de temperatura coletados após 11 de outubro de 2016 até o final das campanhas do 6º ciclo. A aquisição de dados contando com uma segunda fonte foi necessária porque o Projeto REMO passou a não mais processar os dados de temperatura após o dia 16 de outubro de 2016.

⁵ Disponível em: <https://podaac.jpl.nasa.gov/dataset/DMI_OI-DMI-L4-GLOB-v1.0>

- **CORRENTES OCEÂNICAS:** Os dados de correntes oceânicas (**Figura V.2-10**) foram obtidos do projeto OSCAR (Ocean Surface Current Analyzes - Real Time) da NOAA, que publica estimativas globais das correntes de superfície do oceano, combinando observações de satélites de altímetros que medem a altura da superfície do mar⁶, os dispersores que estimam os vetores de vento do oceano⁷ e sensores de temperatura da superfície do mar⁸. O objetivo do projeto OSCAR é fornecer estimativas de corrente oceânica mais precisas que aquelas baseadas em altimetria, particularmente em regiões tropicais, ao combinar a dinâmica de cisalhamento geostrofica, Ekman e Stommel e um termo complementar do gradiente de flutuação da superfície (BONJEAN & LAGERLOEF, 2002).

⁶ por exemplo, TOPEX / Poseidon.

⁷ por exemplo, QuikSCAT

⁸ por exemplo, AVHRR

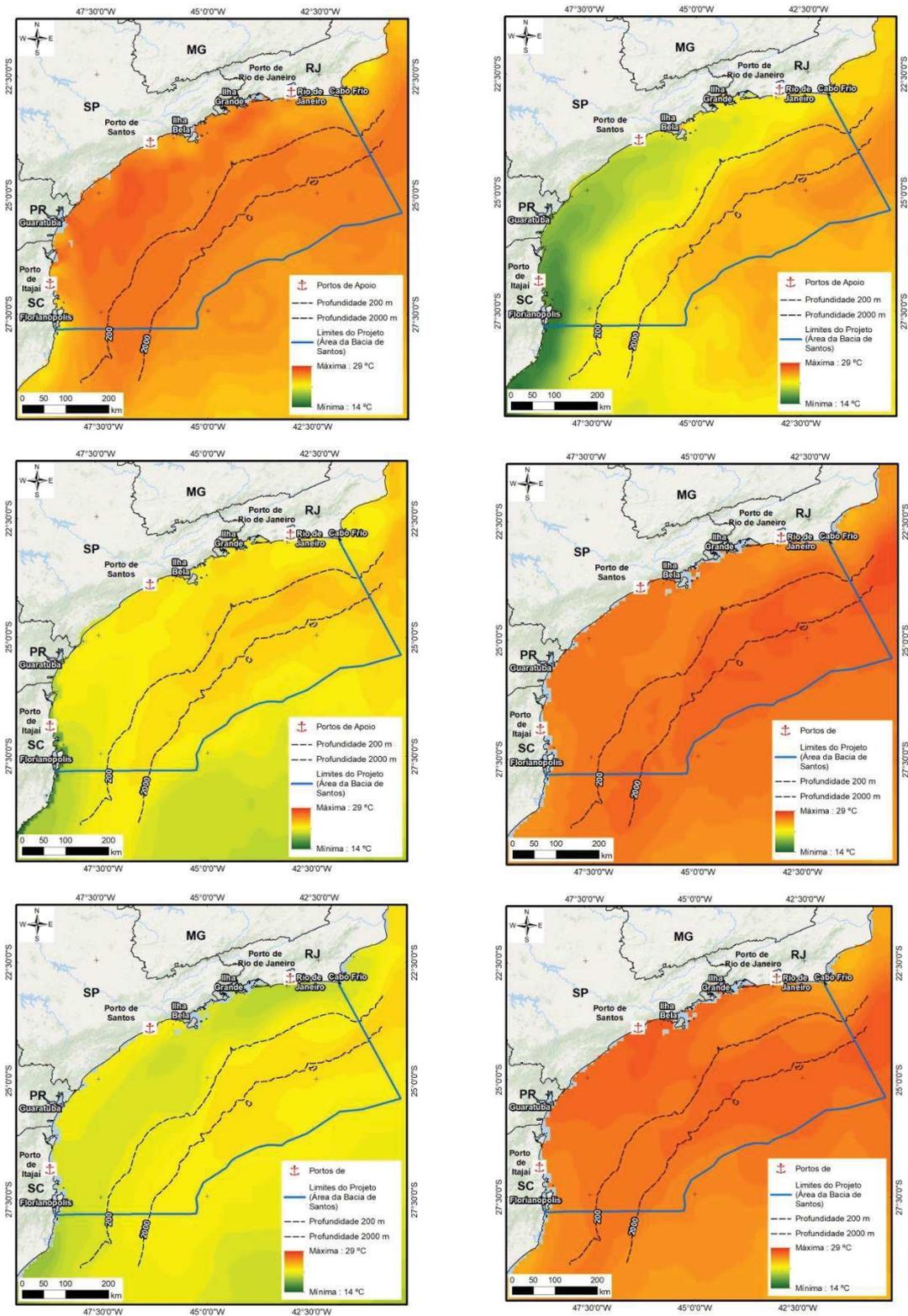


Figura V.2-9: Temperatura (em graus Celsius) da Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

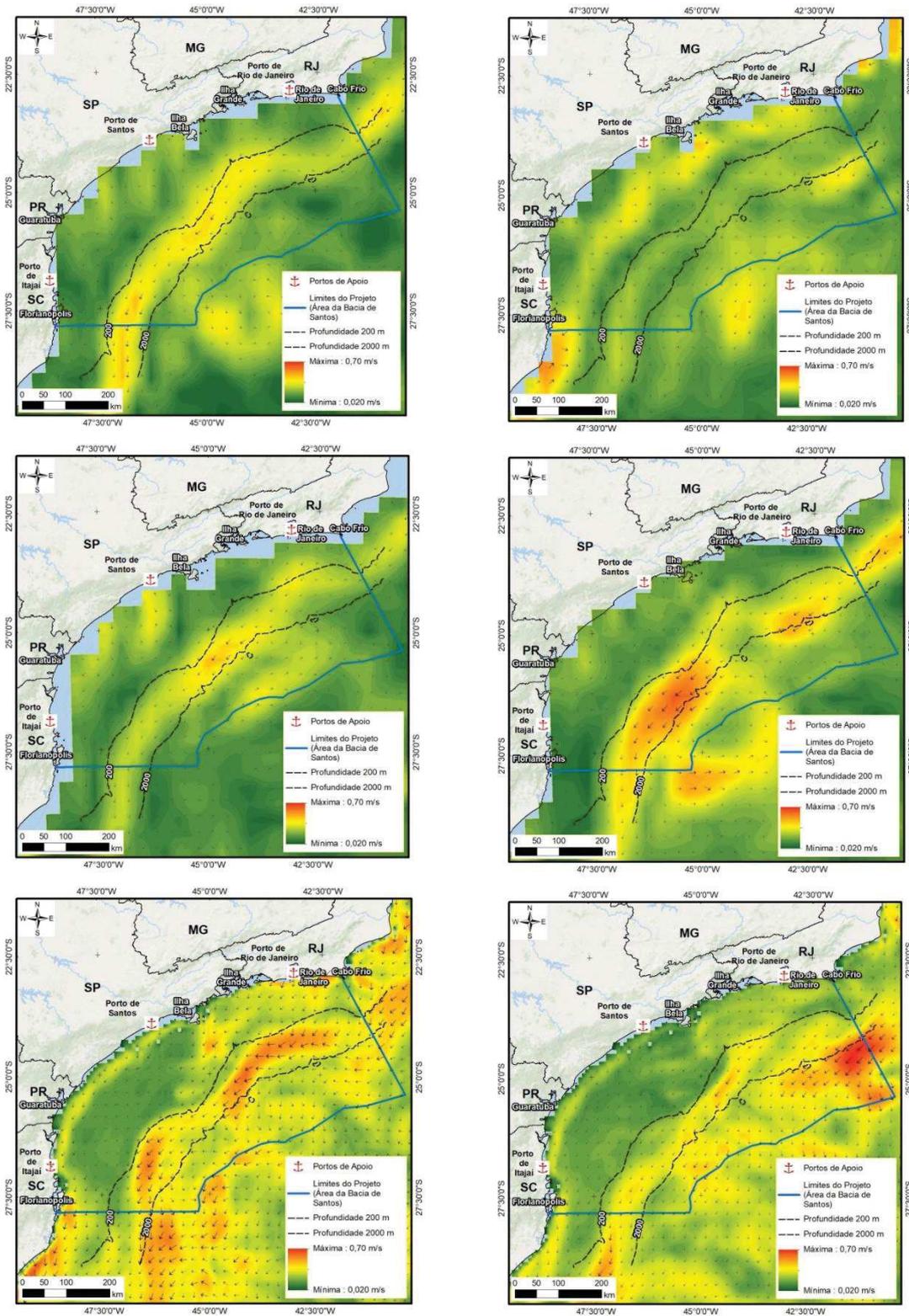


Figura V.2-10: Velocidade (em m/s) e direção das correntes marítimas da Baía de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

- **CLOROFILA:** Os dados de concentração de clorofila-a foram obtidos do Grupo OceanColor da NASA GSFC⁹, que disponibiliza dados Rasters climatológicos para um produto de Imagem Padrão Nível 3 (SMI) (**Figura V.2-11**). O OceanColor Group da NASA Goddard Space Flight Center (GSFC) publica uma variedade de produtos de imagem de satélite derivados de observações de cores oceânicas feitas por sensores em órbita polar, como MODIS, SeaWiFS, OCTS e CZCS.

Segundo o projeto, o algoritmo fornece a concentração superficial de clorofila-a em mg/m³. Este algoritmo usa uma relação empírica derivada de medições *in situ* de clorofila e de reflectâncias de sensoriamento remoto na região azul-para-verde do espectro visível. A implementação está subordinada à disponibilidade de três ou mais bandas de sensores abrangendo o regime espectral 440 - 670 nm. O produto que resulta nos dados de clorofila-a está incluído como parte do conjunto de produtos padrão do Level-2 OC e do conjunto de produtos CHL do Level-3.

SALINIDADE: Os dados de Salinidade foram obtidos do modelo HYCOM. O projeto é mantido como um único código fonte escalável / portátil pelo Centro de Recursos Compartilhados Maiores do Office Oceanográfico Naval (NAVOCEANO). As forçantes do modelo oceânico vem da Reanálise do Sistema de Previsão Climática do Centro Nacional de Previsão Ambiental (NCEP) (CFSR, SAHA et al., 2010). As condições de limite aberto são fornecidas pela reanálise HYCOM global. Os dados são interpolados para uma grade uniforme de 1/25° (GOMu0.04), convertidos para NetCDF e interpolados para 40 níveis, podendo entregar resultados das seguintes (5) variáveis: Elevação do fundo do oceano, Temperatura da água, Salinidade da água do Mar, Velocidade (sentido norte) e Velocidade (sentido leste). Os resultados obtidos para salinidade são medidos em PSU (Practical Salinity Unit) (**Figura V.2-12**).

⁹ Disponível em: <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/atbd/chlor_a/>

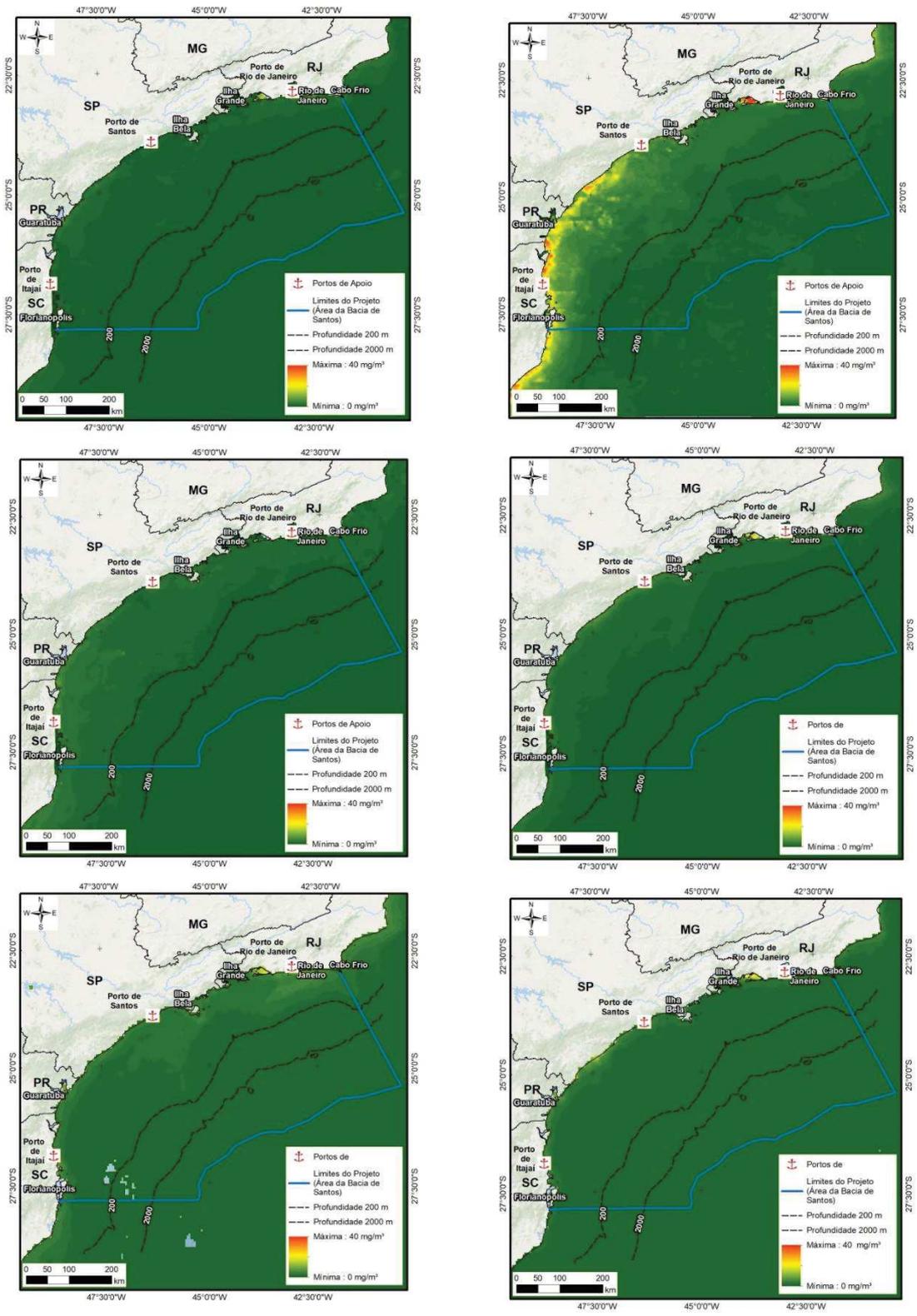


Figura V.2-11 Clorofila a (em mg/m^3) da Baía de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

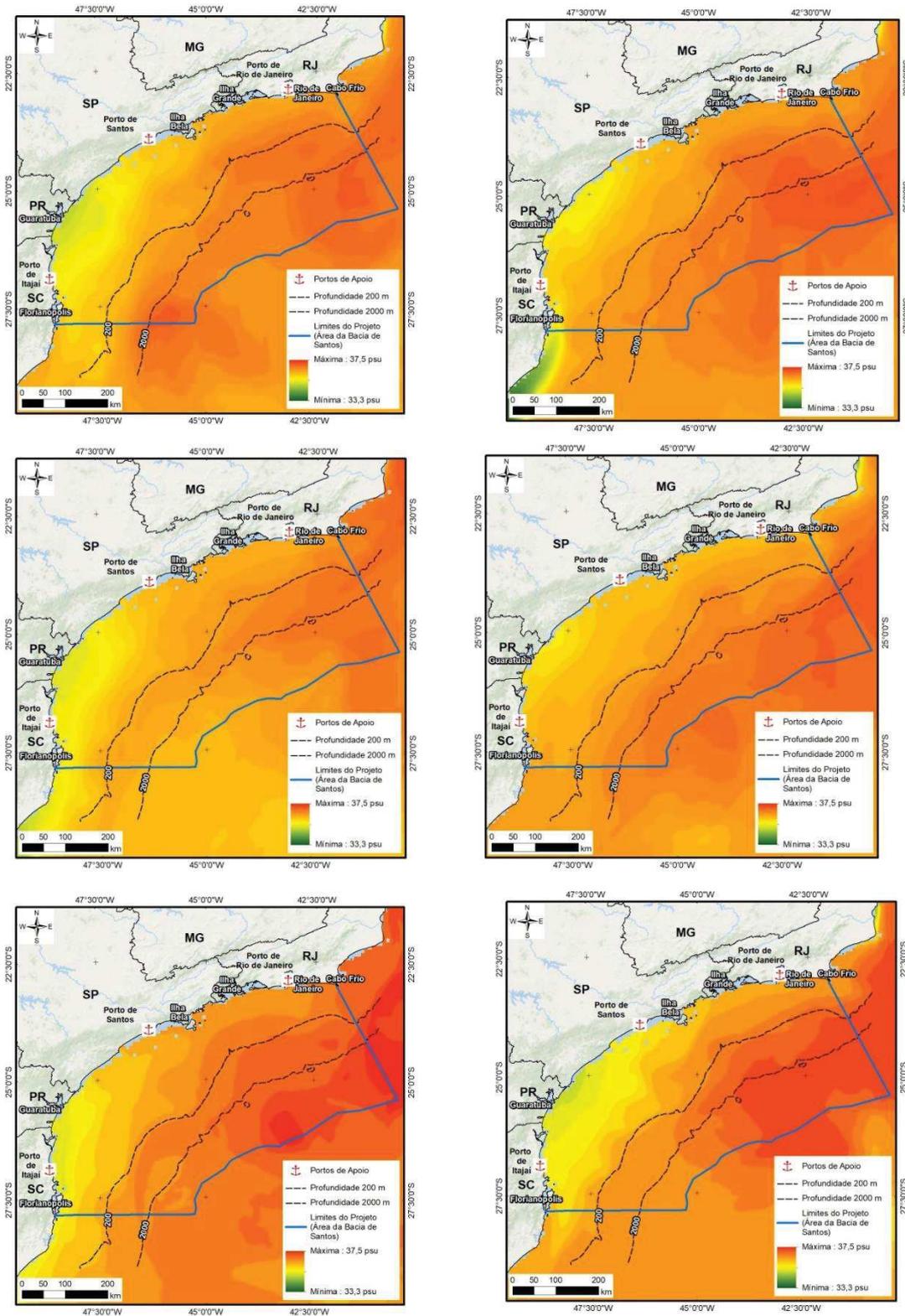


Figura V.2-12: Salinidade (em psu) da Baía de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

- **TRÁFEGO DE EMBARCAÇÕES:** Esta variável antrópica foi descrita pela intensidade de tráfego marítimo em cada quadrante, medido pela distância percorrida pelas embarcações em metros dentro do quadrante (**Figura V.2-13**). Esses dados foram fornecidos em caráter mensal pelo Programa de Monitoramento do Tráfego de Embarcações (PMTE) da Bacia de Santos.

- **PROXIMIDADE DE UNIDADES DE PRODUÇÃO DE ÓLEO E GÁS:** Esta variável consiste na distância mais próxima da borda do quadrante até a unidade de exploração/produção de petróleo e/ou gás.

- **ATIVIDADES DE PESCA:** Os eventos de pesca foram coletados concomitantemente com o esforço de registros de cetáceos durante toda a execução das campanhas de campo do PMC-BS. Durante as Campanhas de Avistagem Embarcada, foram registradas todas as embarcações e/ou petrechos de pesca observados ao longo das linhas de transecção (**Figura V.2-14**). O número de registros foi então contabilizado para cada quadrante.

- **PAISAGEM ACÚSTICA:** A caracterização da paisagem acústica submarina foi feita por meio de medições dos níveis de pressão sonora (SPL) do ruído ambiente da região da Bacia de Santos, no âmbito do Projeto de Monitoramento da Paisagem Acústica Submarina (PMPAS) (**Figura V.2-15**). Foram utilizados perfiladores lagrangeanos (PABLO) e gliders, que fazem parte da estratégia de monitoramento móvel (equipamentos de navegação autônoma) (mais detalhes ver IPQM, 2017). Os perfiladores têm a capacidade de realizar mergulhos e coletar dados em diferentes profundidades de estacionamento. O equipamento não armazena os arquivos de áudio, fornecendo apenas os resultados das medições. A taxa de amostragem do áudio é de 24 kHz. Os gliders são veículos submersíveis autônomos (AUVs) controlados por satélite que tem a capacidade de realizar manobras de rolagem e arfagem e coletar dados de diferentes profundidades de maneira contínua. Os dados de acústica são gravados e armazenados em arquivos de áudio por

um cartão de memória interno para serem recuperados posteriormente. A taxa de amostragem utilizada foi de 125 kHz. Foram utilizadas duas unidades de gliders que foram programados para fazerem mergulhos de até 1.000 m, com registro contínuo (cerca de 3 horas) durante a descida. As trajetórias eram alteradas a cada 3 meses, abrangendo áreas com diferentes usos dentro da Bacia de Santos.

Amostras de 1 minuto de gravação foram extraídas e segmentadas em janelas de análise de 170 ms, correspondendo a 351 medições de ruído para cada minuto de gravação. Mapas dos níveis de SPL com resolução espacial de 1/6 de grau (quadrados de 18,5 km de lado) foram produzidos (mediana dos valores SPL RMS) para os quadrados que tiveram 5 ou mais medições válidas. Os dados foram analisados considerando 4 bandas de 1/3 oitavas: 125 Hz, 500 Hz e 1000 Hz. As profundidades foram separadas em 3 faixas: 1) 0 – 100 m; 2) 150 – 300 m; e 3) 900 – 1000 m. Os mapas apresentados pelo PMPAS-BS foram separados pelo tipo de equipamento utilizado, as métricas de SPL empregadas e as faixas de profundidade definidas.

O cruzamento de dados realizado pelo PMC-BS considerou o SPL RMS (valor quadrático médio do nível de pressão sonora), condizente com a medição de sinais contínuos. As bandas de frequência selecionadas foram as de 1/3 oitava em 63 Hz e 125 Hz, reconhecidas como aquelas que possuem os maiores incrementos relacionados ao tráfego de embarcações de grande porte. A profundidade considerada foi a mais próxima da superfície (faixas de 0 – 100 m), que corresponde à camada de água utilizada por todos os cetáceos, apesar de existirem espécies que também utilizam camadas mesopelágicas para se alimentar, podendo atingir profundidades de mais de 1.000 m.

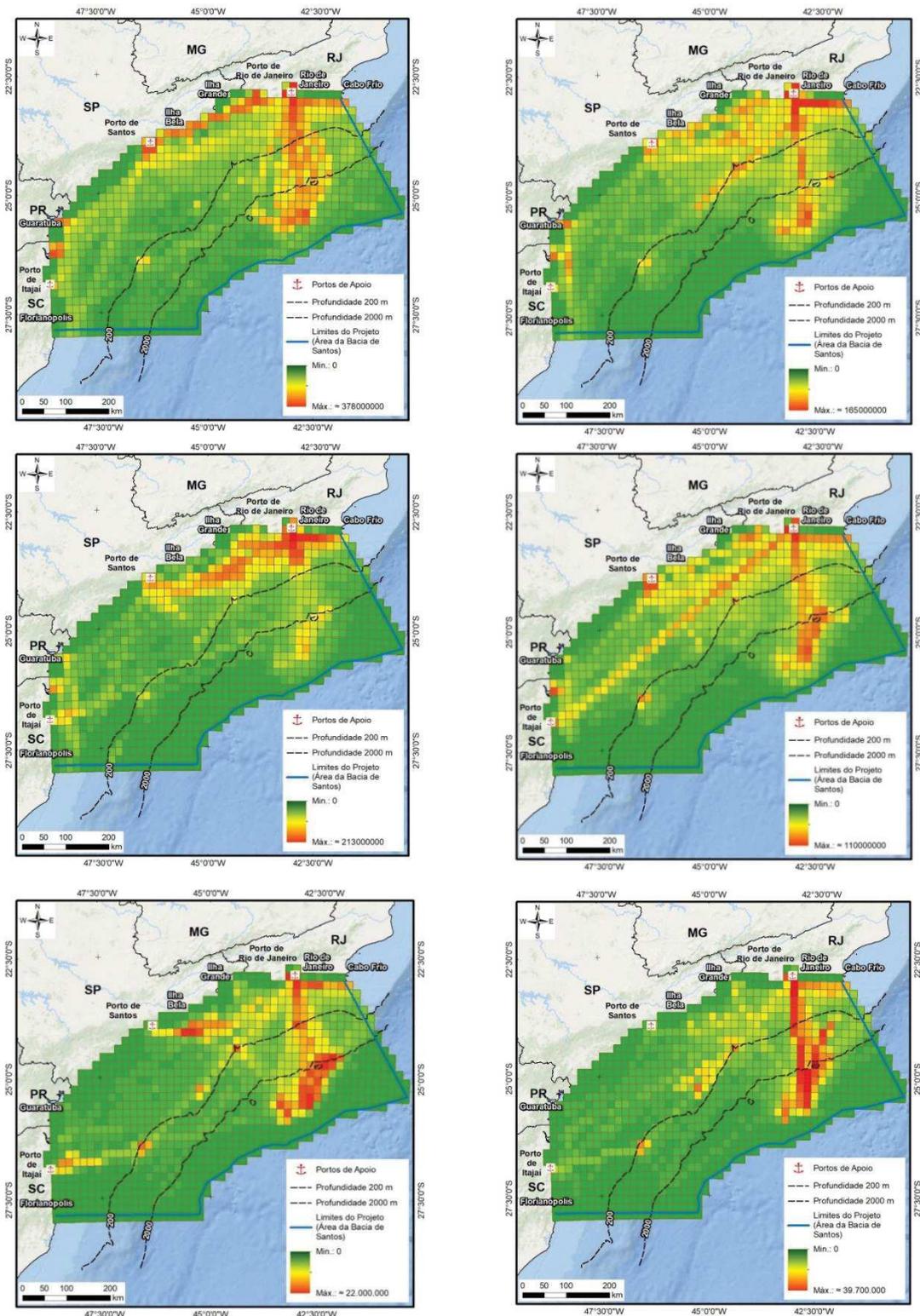


Figura V.2-13: Intensidade de tráfego de embarcações durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS em grid com quadrantes de 16 km. Escala de valores difere entre os mapas.

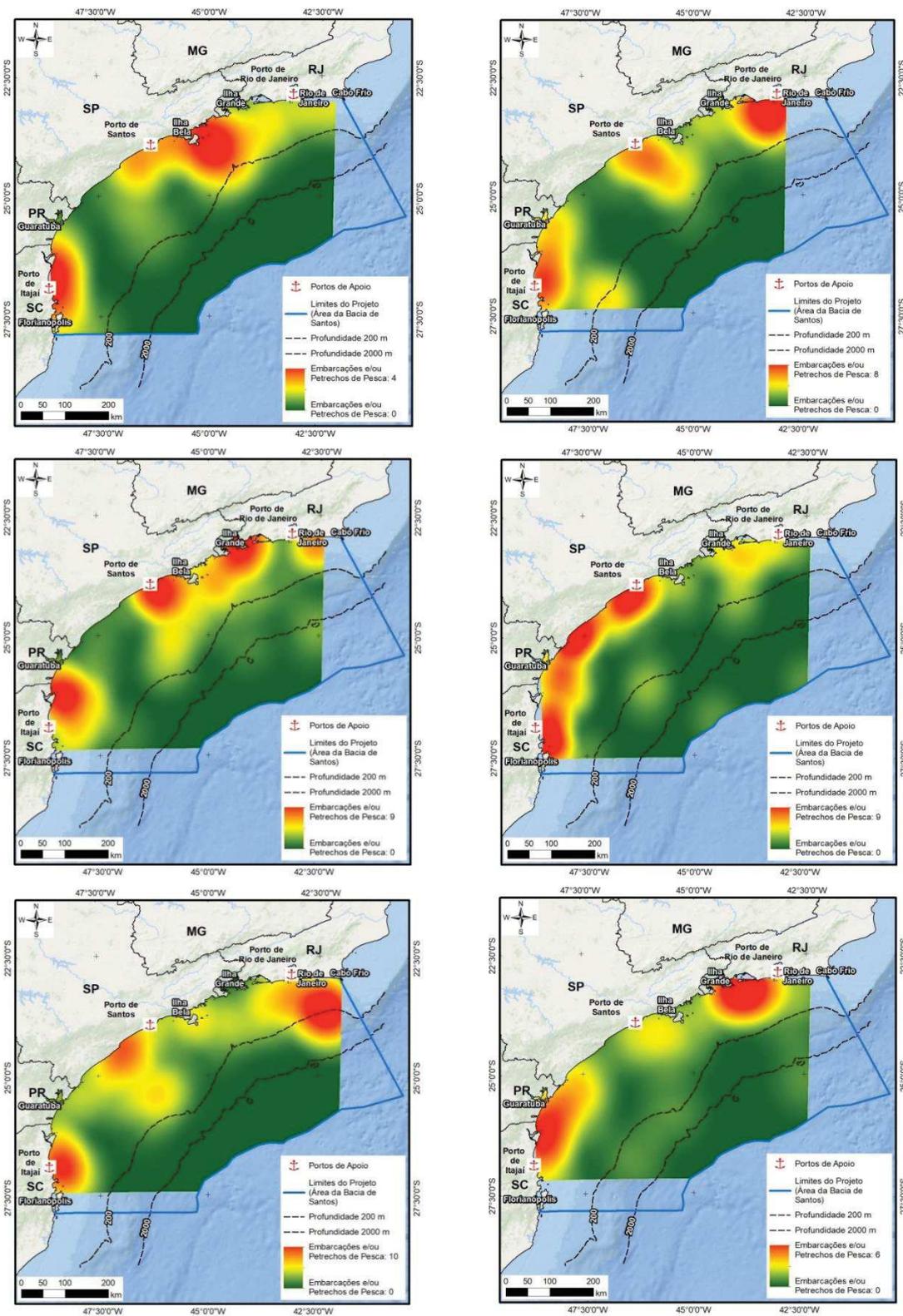
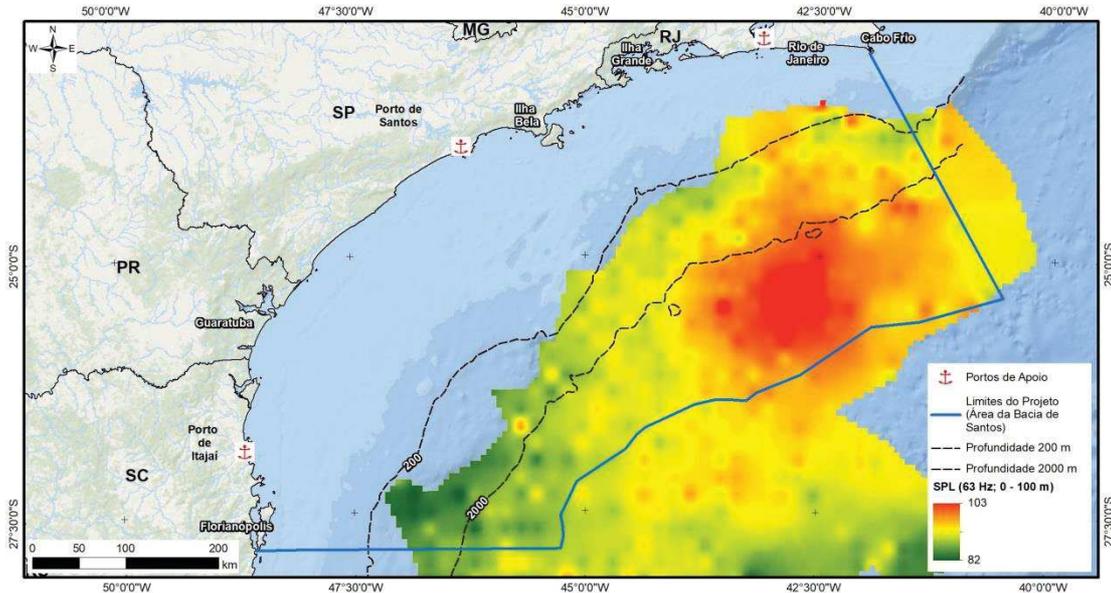


Figura V.2-14: Intensidade de atividades de pesca durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS. Escala de valores difere entre os mapas.

Intensidade de ruído (SPL) na frequência de 63 Hz



Intensidade de ruído (SPL) na frequência de 125 Hz

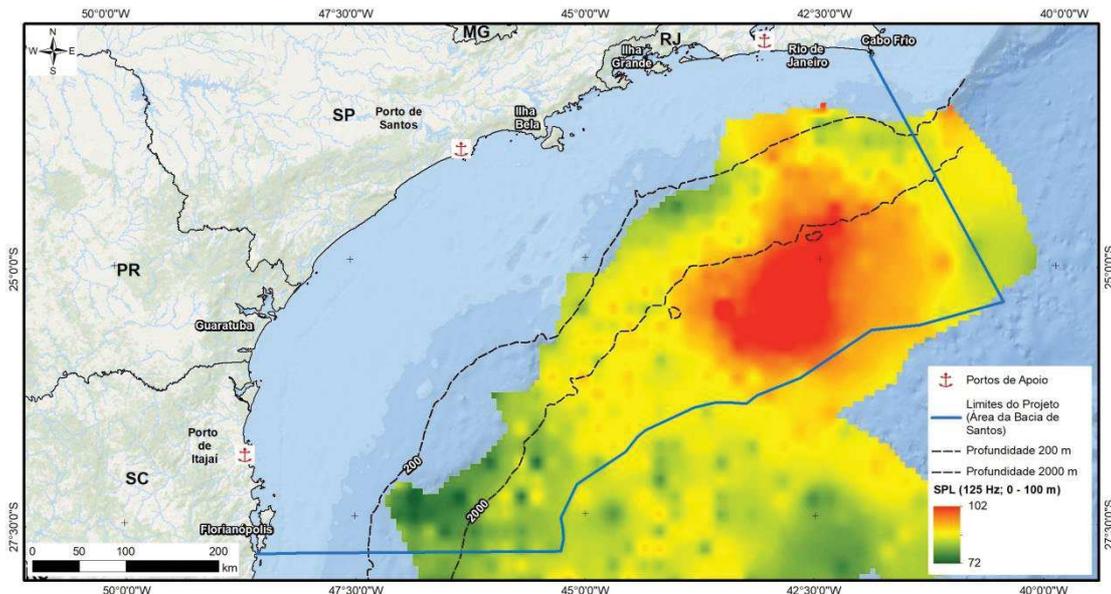


Figura V.2-15: Intensidade de ruídos nas faixas de frequência de 63 e 125 Hz a 100 metros de profundidade na Bacia de Santos entre 2015 e 2017.

Processamento dos dados ambientais

Todos os dados satelitais analisados neste estudo contaram com o auxílio da ferramenta Marine Geospatial Ecology Tools (MGET), também conhecida como o pacote GeoEco Python. O MGET é uma “caixa de ferramentas” de

geoprocessamento de fonte aberta projetada para pesquisadores costeiros e marinhos e analistas de GIS que trabalham com dados ecológicos e oceanográficos. Ele permite o acesso aos dados oceanográficos; a identificação de características oceanográficas ecologicamente relevantes em imagens de sensoriamento remoto; e a detecção de padrões espaço-temporais em dados de séries temporais.

O acesso aos dados é realizado com base nas datas de cada uma das campanhas e no tipo de informação que se deseja adquirir, gerando, assim, a média das informações em cada intervalo. Em média, para cada dia de amostragem foi utilizada uma imagem de satélite. Ou seja, para uma campanha de 40 dias, por exemplo, foram usadas em média 40 imagens para gerar a composição da variável para a campanha. Os dados são adquiridos em formato Raster, cuja informação fica relacionada ao pixel, e vão corresponder, respectivamente, à resolução espaço-temporal de cada sensor.

Os processamentos desses dados resultaram em um arquivo Raster de toda a área do projeto e adjacências, de cada um dos parâmetros analisados, para cada uma das campanhas realizadas. De posse da setorização dos blocos de análise, realizou-se o cruzamento dos setores com os dados de satélite, resultando, assim, no valor médio de cada parâmetro, em cada bloco.

A ferramenta *Zonal Statistical as Table* em ambiente GIS possibilitou esse processo. Ela resume os valores de um Raster dentro das zonas de outro conjunto de dados e repassa os resultados a uma tabela. Dessa maneira, a média dos registros dos pixels existentes naquela região foi extraída de dentro da área de cada bloco de análise.

Análises dos dados

Seguindo o mesmo procedimento do segundo ano do PMC-BS (PETROBRAS, 2017), dois conjuntos de modelos foram construídos e analisados, um para misticetos e outro para odontocetos. Nos dois casos, a variável resposta ou dependente foi o número de detecções total no quadrante durante as seis campanhas. O número de detecções foi corrigido pelo esforço, que foi incluído como o logaritmo natural do comprimento total de rotas

navegadas dentro do quadrante. O esforço foi incluído como um termo *offset* no modelo.

Os dados foram analisados usando Modelos Generalizados Lineares (GLM) com distribuição de erros Binomial Negativa (MCCULLAGH & NELDER, 1989). Em função da grande quantidade de quadrantes com nenhuma detecção (82% de zeros para odontocetos e 92% de zeros para os mysticetos), optou-se por uma distribuição que adote a sobre-dispersão dos dados, como a distribuição Binomial Negativa.

Foram consideradas 19 variáveis explanatórias conforme descrição na **Tabela V.2-1**. As variáveis foram avaliadas quanto à sua correlação, pois a colinearidade (correlação entre variáveis explanatórias) pode ser um problema para os GLM (ZUUR et al., 2007). Algumas variáveis explanatórias estavam fortemente correlacionadas, tanto positivamente quanto negativamente (**Figura V.2-16**). As duas mensurações de ruído estavam fortemente correlacionadas positivamente, indicando que ambos parâmetros refletem o ruído produzido na Bacia de Santos. Houve correlação entre diferentes parâmetros da mesma variável, como a clorofila-a média e máxima (correlação positiva), profundidade média e mínima (negativa), profundidade média e máxima (negativa), profundidade mínima e máxima (negativa), temperatura mínima e variação da temperatura (positiva). Outras variáveis correlacionadas incluíram a declividade média e a variação na profundidade (negativa) e os ruídos com a profundidade média, mínima e máxima (positiva). As variáveis correlacionadas não foram incluídas em um mesmo modelo.

Considerando a grande quantidade de zeros, inicialmente optou-se por construir modelos mais simples, contendo apenas uma variável. A partir dos modelos mais simples eventualmente foi adicionada uma ou mais variáveis, quando pertinente. O melhor modelo foi escolhido com base no menor valor de AIC, que reflete o bom ajuste do modelo aos dados e penaliza pelo número de parâmetros do modelo (BURNHAM & ANDERSON, 2002).

Tabela V.2-1: Variáveis consideradas na modelagem de habitat.

Abreviação	Variável
Prof_m	Profundidade média (em metros)
Prof_u	Profundidade máxima (em metros)
Prof_d	Profundidade mínima (em metros)
Prof_r	Variação da profundidade (em metros)
Decli_m	Declividade média (em graus)
Decli_r	Variação da declividade (em graus)
Veloc_m	Velocidade média da corrente (em m/s)
Temp_m	Temperatura média da superfície (em graus Celsius)
Temp_u	Temperatura máxima (em graus Celsius)
Temp_d	Temperatura mínima (em graus Celsius)
Temp_v	Variação da temperatura (em graus Celsius)
Sal_m	Salinidade média (psu)
Clor_m	Clorofila-a média (mg/m ³)
Clor_u	Clorofila-a máxima (mg/m ³)
Dist	Distância de unidade de produção/exploração de óleo ou gás
Boat	Intensidade do tráfego de embarcações (em metros percorridos no quadrante)
Pesca	Intensidade de atividades de pesca (em número de registros no quadrante)
Noise_63	Intensidade de ruído (SPL) na faixa de frequência de 63 Hz a 100 m
Noise_125	Intensidade de ruído (SPL) na faixa de frequência de 125 Hz a 100 m

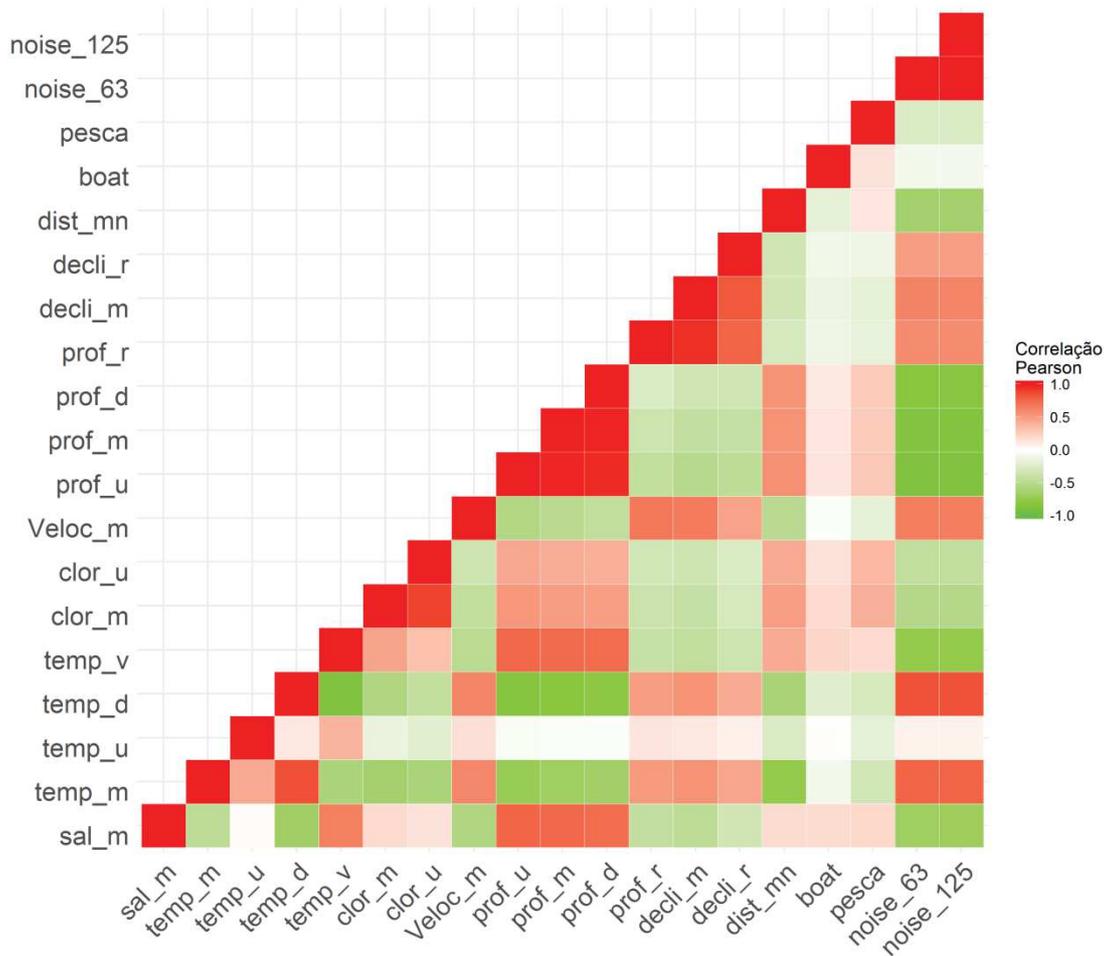


Figura V.2-16: Correlação entre as variáveis explanatórias consideradas na modelagem de uso de habitat.

Modelagem de habitat

Foram construídos 25 modelos considerando o número de grupos de odontocetos detectados na Bacia de Santos em função de diferentes variáveis explanatórias (**Tabela V.2-2**). O melhor modelo levou em consideração três variáveis: profundidade média, temperatura média da água na superfície e clorofila-a média. O modelo que avaliou a profundidade média e a temperatura média também é plausível (Delta AIC < 2). Segundo as previsões do melhor modelo, o número de detecções de odontocetos aumenta conforme aumenta a profundidade, aumenta a temperatura e aumenta a concentração de clorofila (**Figura V.2-17**).

Tabela V.2-2: Modelos Generalizados Lineares (GLM) considerando os efeitos de variáveis ambientais e antrópicas no número de detecções de odontocetos observados durante o PMC na Bacia de Santos.

Modelo	k	AICc	Delta AICc	Peso AICc
Prof_m + Temp_m + Clor_m	5	4974,96	0,00	0,67
Prof_m + Temp_m	4	4976,54	1,58	0,30
Prof_d	3	4982,30	7,35	0,02
Prof_m + Temp_m	5	4984,71	9,76	0,01
Prof_m + Sal_m	4	4984,89	9,94	0,00
Prof_m	3	4989,50	14,54	0,00
Prof_m + Clor_m	4	4991,32	16,36	0,00
Temp_m + Clor_m + Decli_m	5	4994,59	19,63	0,00
Temp_m + Decli_m	4	4996,57	21,61	0,00
Clor_m + Decli_m	4	4996,79	21,83	0,00
Prof_u	3	4999,12	24,16	0,00
Prof_r	3	5002,39	27,44	0,00
Pesca	3	5009,17	34,21	0,00
Decli_m	3	5010,82	35,87	0,00
Decli_r	3	5012,45	37,50	0,00
Sal_m	3	5015,63	40,68	0,00
Clor_m	3	5016,69	41,73	0,00
Temp_v	3	5017,85	42,89	0,00
Clor_u	3	5018,09	43,13	0,00
Boat	3	5019,39	44,43	0,00
Temp_m	3	5019,84	44,88	0,00
Nulo	2	5020,17	45,21	0,00
Veloc_m	3	5021,45	46,50	0,00
Temp_u	3	5021,69	46,73	0,00
Dist_mn	3	5022,18	47,22	0,00

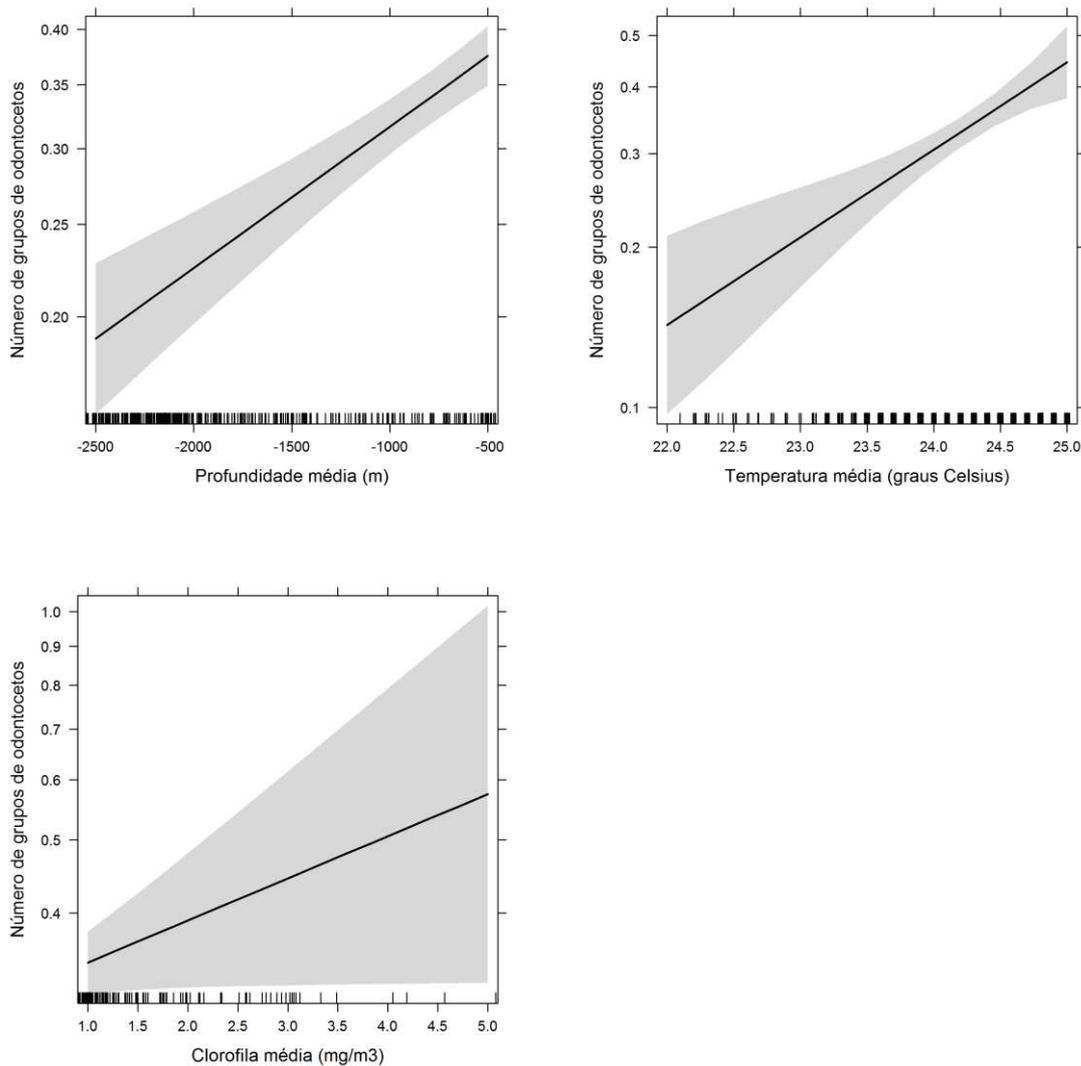


Figura V.2-17: Previsões do melhor GLM para o número de detecções de odontocetos em quadrantes na Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

Para os mysticetos, foram construídos 22 modelos. O melhor modelo considerou as atividades de pesca e a distância de unidades de produção de óleo e gás como variáveis explanatórias (**Tabela V.2-3**). O melhor modelo prevê que o número de detecções de mysticetos aumenta conforme aumenta o número de registros de atividades de pesca e diminui a distância das unidades de produção de óleo e gás (**Figura V.2-18**).

Tabela V.2-3: Modelos Generalizados Lineares (GLM) considerando os efeitos de variáveis ambientais e antrópicas no número de detecções de mysticetos observados durante o PMC na Baía de Santos.

Modelo	k	AICc	Delta AICc	Peso AICc
Pesca + Dist	4	3464,89	0,00	1,00
Pesca + Boat	4	3489,94	25,06	0,00
Pesca + Sal_m	4	3499,88	35,00	0,00
Pesca + Temp_u	4	3504,90	40,01	0,00
Pesca	3	3504,95	40,07	0,00
Pesca + Prof_m	4	3506,77	41,89	0,00
Dist	3	3521,98	57,09	0,00
Boat	3	3524,70	59,82	0,00
Sal_m	3	3529,44	64,55	0,00
Temp_u	3	3533,85	68,96	0,00
Veloc_m	3	3538,23	73,35	0,00
Prof_d	3	3538,65	73,76	0,00
Prof_m	3	3539,69	74,80	0,00
Decli_r	3	3541,01	76,12	0,00
Prof_u	3	3541,15	76,27	0,00
Prof_r	3	3541,46	76,57	0,00
Nulo	2	3542,82	77,93	0,00
Decli_m	3	3542,90	78,02	0,00
Temp_m	3	3544,17	79,28	0,00
Temp_v	3	3544,64	79,75	0,00
Clor_m	3	3544,71	79,83	0,00
Clor_u	3	3544,80	79,91	0,00

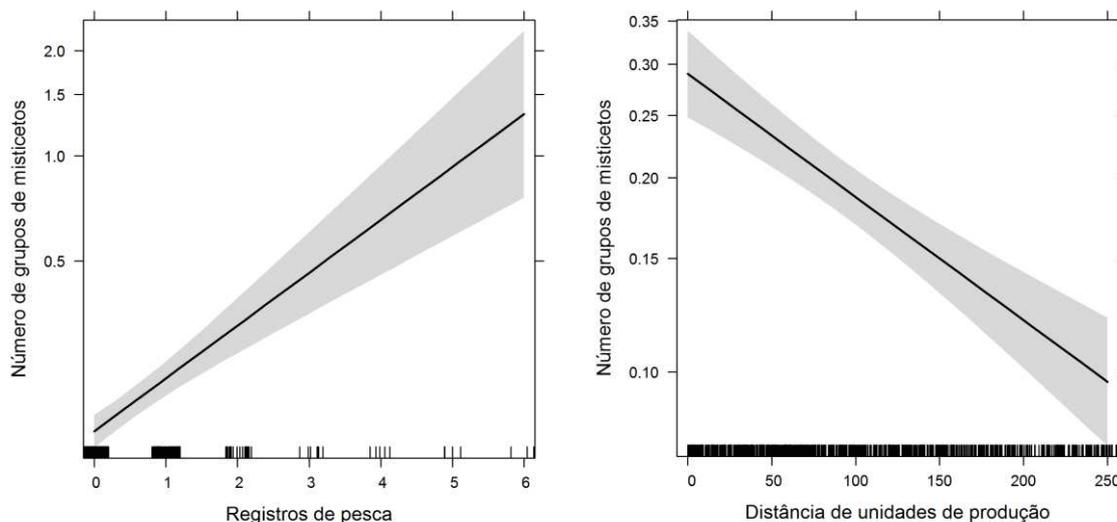


Figura V.2-18: Previsões do melhor GLM para o número de detecções de misticetos em quadrantes na Bacia de Santos durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC.

Para investigar um potencial efeito dos ruídos na distribuição de misticetos e odontocetos foi necessário realizar uma análise separada, com um recorte da área de estudo. Este recorte foi feito para ajustar a área de estudo à região onde haviam dados disponíveis coletados pelos perfiladores acústicos.

Foram ajustados quatro modelos aos dados de detecções de grupos de odontocetos nos quadrantes: (a) profundidade média (variável mais importante nos modelos para odontocetos); (b) intensidade de ruído a 63 Hz; (c) profundidade média + intensidade de ruído a 63 Hz; e (d) modelo nulo. O modelo com melhor suporte dentre os quatro, de acordo com o AIC, foi o que considerou somente a profundidade média como variável explanatória das contagens de odontocetos.

A abordagem usada para os misticetos foi similar, considerando os seguintes modelos: (a) pesca; (b) intensidade do ruído a 63 Hz; (c) pesca + intensidade de ruído a 63 Hz; e (d) modelo nulo. O modelo nulo foi o que teve mais suporte pelo AIC dentre os quatro modelos considerados na análise.

Discussão sobre distribuição e uso de habitat

A distribuição de odontocetos e mysticetos na Bacia de Santos foi heterogênea, o que é uma regra geral na distribuição de animais. Foi possível identificar diversas áreas de concentração (*hot spots*) com maior densidade de grupos. Dentre estas áreas de maior densidade, destacam-se vários setores do talude continental (região de alta declividade entre as isóbatas de 200 e 2.000 m) e a região adjacente a Cabo Frio. Apesar da consistência de determinadas regiões em concentrar as avistagens de grupos de cetáceos, outras regiões de alta densidade foram efêmeras, ocorrendo somente em determinadas campanhas.

Esta variação das áreas de alta densidade entre as campanhas reflete a dinâmica do ambiente marinho da Bacia de Santos, governada por fatores sazonais como a intensidade das duas correntes marítimas que influenciam a região (Corrente de Malvinas e do Brasil) e a ocorrência de fenômenos oceanográficos de média escala, como os giros oceânicos e ressurgências. Estes fenômenos decorrem da interação das correntes marítimas com a topografia da Bacia de Santos e de forçantes climáticas como a incidência de ventos de quadrante Norte e Nordeste (PALMA et al., 2008).

Neste relatório, não foi possível testar modelos que consideram a variação tanto temporal quanto espacial nas contagens dos cetáceos. A variabilidade temporal foi resumida em cada quadrante por meio de estatísticas como os valores máximos, mínimos e amplitude da variação. Esta limitação da modelagem apresentada aqui decorre do fato da maioria dos quadrantes não apresentarem avistagens de cetáceos (quase 87% dos quadrantes para mysticetos e quase 75% dos quadrantes para odontocetos). Esta inflação de zeros é problemática para as técnicas de modelagem estatística (ZUUR et al., 2007). Outra questão importante é a auto-correlação espacial, ou seja, a dependência entre quadrantes vizinhos ou próximos. Neste relatório optou-se por não adicionar a temporalidade nas análises para não exacerbar o problema de inflação de zeros, ou adicionar outros problemas, como a autocorrelação temporal. Dentre as alternativas existentes para resolver estes problemas está o uso de modelos que consideram a autocorrelação, modelos que consideram

a inflação de zeros e construção de *grids* com quadrantes de maior tamanho. Entretanto, estas alternativas demandam o reprocessamento dos dados e espera-se testar estas alternativas nos próximos relatórios anuais.

Para os odontocetos, os modelos de habitat demonstram uma grande importância da batimetria da Bacia de Santos em determinar as áreas de concentração dos grupos. Esta foi a variável mais importante no melhor modelo do conjunto, prevendo uma maior ocorrência de grupos conforme diminui a profundidade. Este padrão retrata a ocorrência de regiões de alta densidade de odontocetos em águas costeiras e do talude continental, conforme sugerem os mapas de distribuição.

Outro fator importante na distribuição dos odontocetos foi a temperatura, com o modelo prevendo maior frequência de grupos em regiões mais quentes. Este padrão é aparentemente contraditório, pois águas frias tendem a ter mais oxigênio dissolvido e nutrientes. No presente caso, provavelmente reflete a maior frequência de grupos no talude, pois a ressurgência de Cabo Frio e a Corrente das Malvinas, ambas com águas mais frias, estão localizadas próximas da costa.

Finalmente, o melhor modelo considerou a concentração de clorofila-a, que reflete a produtividade primária, com maior frequência de avistagens em regiões mais produtivas. Entretanto, o coeficiente estimado para esta variável teve um grande erro associado, que pode ser decorrente da variabilidade temporal que não foi considerada na modelagem.

Para mysticetos, duas variáveis antrópicas foram as mais adequadas para explicar a variabilidade nas contagens de grupos nos quadrantes: a quantidade de registros de pesca e a distância das unidades de produção de óleo e gás. No entanto, estas variáveis tiveram influência positiva no número de grupos observados, ou seja, a frequência de grupos de baleias aumentou concomitantemente com os registros de pesca e quanto mais próximo das unidades de produção de óleo e gás. A explicação mais provável é que exista uma correlação destas variáveis com a frequência de grupos de mysticetos, mas sem relação causal.

A variável mais importante no melhor modelo para mysticetos foi o número de registros de pesca, que estão concentrados em regiões costeiras ao longo de toda a Bacia de Santos. Esta distribuição coincide parcialmente com os hábitos da baleia-de-Bryde e da baleia-jubarte, os mysticetos mais abundantes durante o PMC-BS, com concentração na região da costa do Estado do Rio de Janeiro. A proximidade com unidades de produção de óleo e gás aparentemente reflete a distribuição da baleia-jubarte, cuja rota de migração passa por regiões oceânicas do norte da área de estudo (ZERBINI et al., 2006), onde as atividades do pré-sal se concentram.

Em relação ao relatório anterior (ano 2), destacamos a inclusão de duas variáveis antrópicas adicionais na modelagem de habitat: a atividade de pesca e a intensidade de ruídos em duas bandas de frequência que refletem os ruídos antropogênicos. Aliás, de maneira geral, o conjunto de variáveis ambientais e antrópicas utilizado aqui é bastante robusto. Espera-se que nos próximos anos haja avanços na parte analítica, por meio do uso de modelos mais robustos e menos sensíveis a potenciais problemas nos dados (como a inflação de zeros) e, com o incremento amostral, a construção de modelos para espécies ou gêneros mais abundantes.

V.2.2 Movimentos - Telemetria

Ao longo dos três primeiros anos do PMC-BS, foram definidas diferentes programações para os transmissores, considerando conhecimentos existentes na literatura para cada espécie, assim como a experiência adquirida ao longo do processo e aquela dos tagueadores. Os transmissores foram programados para transmitir durante 12 ou 13 horas por dia, e com um máximo de 450 transmissões por dia, buscando otimizar o uso da bateria para os períodos com melhor cobertura de satélites na região de estudo. As previsões de passagem de satélites foram obtidas na *homepage* do Argos para determinar os melhores horários do dia para transmissão, considerando a passagem dos satélites.

O reduzido tempo de permanência dos cetáceos na superfície da água restringe o número de sinais enviados ao satélite, resultando numa elevada proporção de posições de baixa qualidade ou de qualidade indefinida (FREITAS et al., 2008). Apenas os pontos resultantes após a filtragem dos dados foram utilizados nas análises de distribuição e movimentação dos animais. Após a filtragem, o número restante de posições variou de 63,6 a 95,3% para os transmissores na configuração implantável e de 20,6 a 88,3% para os transmissores na configuração LIMPET. Foi calculada a velocidade média diária percorrida por cada animal, em km/dia, como sendo a distância total percorrida dividida pelos dias. Para alguns transmissores, os dados foram muito limitados, o que não permitiu análises posteriores. Nesses casos, os transmissores permaneceram um período muito reduzido, o que pode estar relacionado a problemas de instalação, à falha do transmissor ou mesmo à perda precoce ocasionada pelo comportamento dos animais.

Foram obtidas informações de 28 indivíduos de oito espécies de cetáceos ao longo de três anos, que permitiram avaliar a movimentação das espécies e uso de habitat na Bacia de Santos (**Tabela V.2-4 e Tabela V.2-5**). Desses, 11 foram sexados geneticamente por meio de amostras coletadas por biópsia.

Tabela V.2-4: Informações sobre os indivíduos marcados com sucesso com transmissores satelitais nas seis Campanhas de Telemetria do PMC-BS. PTT = número de identificação do transmissor no sistema Argos; PT = total de pontos de localização recebidos; PF = total de pontos resultantes após a filtragem; DP = distância percorrida pelo indivíduo desde a data de marcação até o último ponto registrado, em km; VMD = velocidade média diária em km/dia.* Indica os indivíduos para os quais foram obtidos poucos dados, sendo excluídos das análises posteriores. Não foi possível realizar a biópsia em alguns indivíduos, o que impossibilitou a sexagem genética.

N	PTT	Espécie	Dias	PT	PF	%	DP	VMD	Sexo
1	158551	<i>T. truncatus</i>	8	68	54	79,4	503,2	62,9	--
2	158544	<i>T. truncatus</i>	13	108	89	82,4	918,9	70,7	--
3	158542	<i>M. novaeangliae</i>	19	296	282	95,3	462,1	24,3	Macho
4	158553	<i>M. novaeangliae</i>	15	187	141	75,4	1.501,2	100,1	--
5	158554	<i>M. novaeangliae</i>	3	11	7	63,6	38,9	12,9	--
6	158546	<i>B. borealis</i>	6	87	66	75,9	338,9	56,5	--
7	158549	<i>B. physalus</i> *	2	7	Sem dados após filtro				--
8	158547	<i>O. orca</i>	3	36	30	83,3	147,3	49,1	Macho
9	162628	<i>O. orca</i>	13	170	145	85,3	682,4	52,5	Macho
10	162629	<i>B. borealis</i>	7	34	7	20,6	452,9	64,7	Macho
11	162630	<i>B. borealis</i>	38	409	305	74,6	3.533,1	92,9	--
12	162631	<i>T. truncatus</i>	4	9	3	33,3	64,72	16,2	--
13	158556	<i>M. novaeangliae</i>	9	66	59	89,4	117,12	13,0	Fêmea
14	162634	<i>T. truncatus</i>	4	44	24	54,5	158,7	39,7	Fêmea
15	162632	<i>T. truncatus</i>	7	74	56	75,7	515,7	73,7	Fêmea

N	PTT	Espécie	Dias	PT	PF	%	DP	VMD	Sexo
16	162637	<i>T. truncatus</i>	10	125	105	84	665,9	66,6	--
17	166666	<i>B. bonaerensis</i>	18	174	72	41,4	1.845,9	102,5	Macho
18	34588	<i>M. novaengliae</i>	14	697	591	84,8	5.162,7	95,6	Fêmea
19	166663	<i>T. truncatus</i>	54	120	94	78,3	565,9	40,4	--
20	34686	<i>M. novaengliae</i>	36	409	330	80,7	2.753,5	76,5	--
21	166662	<i>B. brydei</i>	28	107	69	64,5	1.111,1	39,7	--
22	162633	<i>O. orca</i>	33	555	490	88,3	2.692,5	81,6	Macho
23	34775	<i>B. brydei</i>	2	9	7	77,8	34,3	17,1	Fêmea
24	34732	<i>P. macrocephalus</i>	60	368	308	83,7	3.786,1	63,1	--
25	34746	<i>P. macrocephalus*</i>	3	6	2	33,3	4,9	1,6	--
26	34792	<i>P. macrocephalus</i>	4	22	11	50	301,9	75,5	--
27	166665	<i>T. truncatus</i>	12	39	19	48,7	361,4	30,1	--
28	34751	<i>T. truncatus</i>	20	316	264	83,5	1.357,5	68,9	--
29	34754	<i>T. truncatus*</i>	2	11	5	45,4	14,1	7,1	--
30	34756	<i>P. electra</i>	6	40	19	47,5	238,8	39,8	--
31	34773	<i>P. electra</i>	7	55	13	23,6	267,5	38,2	--

Tabela V.2-5: Características dos movimentos e uso de habitat das espécies marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos, considerando os indivíduos para os quais foram obtidas informações. Média \pm Desvio padrão (Mínimo – Máximo).

Espécie	Tags	Posições	Dias de transmissão	Distância percorrida (km)	Faixa latitudinal (em graus)	Profundidade (m)	Distância da costa (km)
<i>Tursiops truncatus</i>	10	713	10,2 \pm 8,6 (4 – 20)	568 \pm 841 (65 – 1.357)	6,2 (22,2 a 28,4°S)	41 \pm 52 (1 – 930)	14,4 \pm 15,3 (0,04 – 147,5)
<i>Megaptera novaeangliae</i>	6	1.410	22,7 \pm 17,3 (3 – 54)	1.673 \pm 1.464 (39 – 5.163)	34,7 (18,2 a 52,9°S)	1.741 \pm 2.119 (2 – 5.438)	382,2 \pm 496,4 (0,06 – 1.610,1)
<i>Orcinus orca</i>	3	665	16,3 \pm 9,8 (3 – 33)	1.174 \pm 1.169 (147 – 2.693)	11,1 (25,2 a 36,3°S)	136 \pm 184 (1 – 1141)	88,8 \pm 63,4 (1,3 – 198,5)
<i>Balaenoptera borealis</i>	3	378	13,3 \pm 7,5 (6 – 27)	1.441 \pm 1.111 (339 – 3.533)	10,8 (23,5 a 34,3°S)	1.328 \pm 928 (150 – 3.870)	185,5 \pm 99,8 (59,2 – 518,5)
<i>Peponocephala electra</i>	2	32	6 e 7	239 e 268	0,8 (24,2 a 25,0°S)	1.834 \pm 285,8 (1.266 – 2.276)	171,2 \pm 17,3 (138,3 – 220,0)
<i>Physeter macrocephalus</i>	2	319	4 e 60	302 e 3.786	5,2 (27,4 a 32,6°S)	1.633 \pm 476,6 (697 – 2.883)	180,0 \pm 31,9 (121,7 – 267,7)
<i>Balaenoptera brydei</i>	2	76	2 e 28	34 e 1.111	2,7 (22,6 a 25,3°S)	75 \pm 123 (5 – 605)	27,9 \pm 42,8 (0,23 – 129,9)
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	1	72	18	1.846	9,9 (15,4 a 25,3°S)	1.092 \pm 1.055 (85 – 4.160)	104,2 \pm 43,5 (3,0 – 163,1)
TOTAL	29	3.665	443	30.550	-	-	-

Golfinho-nariz-de-garrafa, Tursiops truncatus

Foram marcados 12 *Tursiops truncatus*, sendo esta a espécie com o maior número de transmissores instalados. Foi realizada a marcação de indivíduos em todas as campanhas, com exceção da 5ª Campanha. Contudo, não houve a transmissão de dados para dois animais. A duração média do monitoramento foi de 10 dias. Todos os indivíduos foram marcados com transmissores na configuração LIMPET, com três pétalas.

Nove indivíduos foram marcados na região costeira e apenas um indivíduo foi marcado na região oceânica, próximo do talude (147,5 metros de profundidade). A profundidade média das áreas utilizadas foi de 41 metros (± 52 m) (**Tabela V.2-5**). A distância média percorrida variou de 16,2 a 140,3 km/dia, chegando a um máximo de 1.357 km percorridos. A maioria dos animais marcados se movimentou ao longo da costa sul e sudeste da Bacia de Santos, entre 22,2 a 28,4°S, desses, três animais se movimentaram entre o Paraná e Santa Catarina, um animal permaneceu ao longo da costa de Santa Catarina, quatro animais se movimentaram ao longo da costa do Rio de Janeiro e um animal se movimentou entre a costa de São Paulo e Rio de Janeiro. Os indivíduos alternaram entre movimentos erráticos ao longo de determinados trechos da costa e movimentos direcionados para regiões específicas (**Figura V.2-19 e Figura V.2-20**).

Todos os indivíduos marcados tinham um padrão de coloração típico do ecótipo oceânico da espécie e todos os indivíduos com biópsia (n = 5) apresentaram haplótipos do ecótipo oceânico na região controle do DNA mitocondrial. Os dados indicam que o ecótipo oceânico de *T. truncatus* realiza deslocamentos de longa distância em curtos intervalos de tempo, com uma extensa área de vida ao longo da costa sul e sudeste do Brasil, com grande flexibilidade no uso de habitat. O único indivíduo marcado na região oceânica transmitiu por um período bastante reduzido, o que dificultou a análise mais detalhada de seus movimentos. Durante quatro dias, o animal permaneceu na mesma região em que foi marcado.

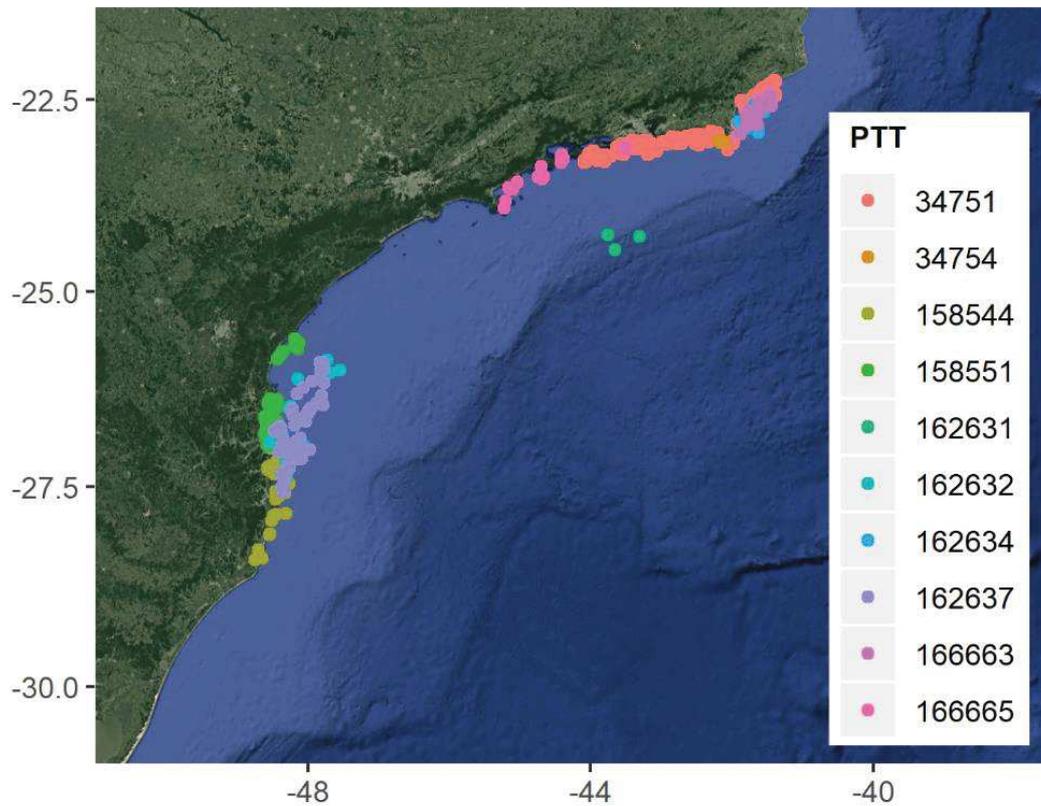


Figura V.2-19: Movimentação dos golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

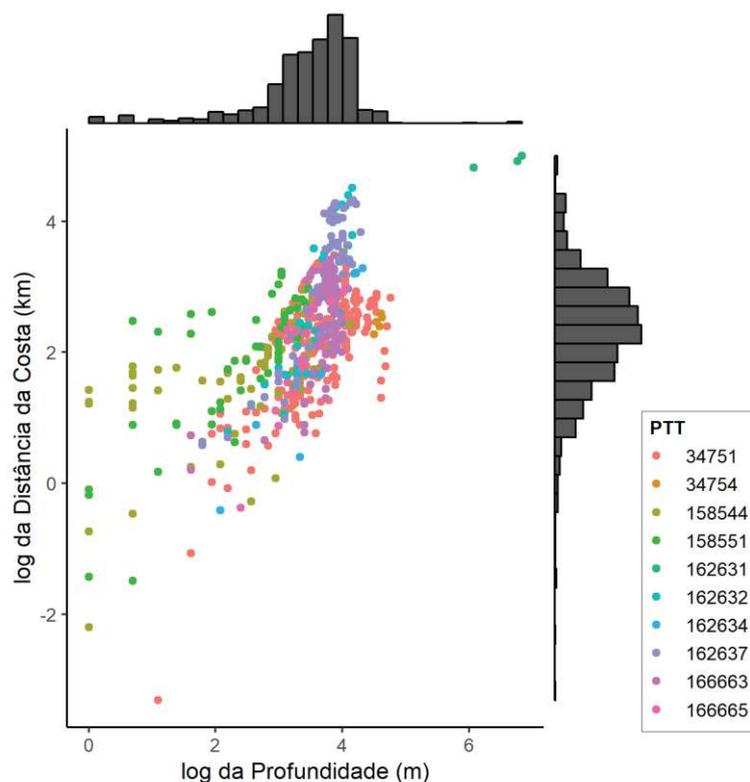


Figura V.2-20: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) dos golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

Tursiops truncatus é uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo em águas tropicais e temperadas e ocupando uma variedade de habitats, incluindo águas pelágicas, baías costeiras e estuários ao longo de toda sua distribuição (LEATHERWOOD & REEVES, 1983). As populações costeiras são mais conhecidas e apresentam uma ampla variedade de padrões de movimentação (SHANE et al., 1986).

No Atlântico Sul Ocidental, são reconhecidos dois ecótipos, ou mesmo subespécies: *Tursiops truncatus truncatus* (ecótipo oceânico) e *T. t. gephyreus* (ecótipo costeiro) (COSTA et al., 2016), baseados na análise de diferenças na morfologia craniana e da coluna vertebral de animais encontrados mortos nas praias. Esta definição é bastante recente, por isso, a maior parte da literatura considera a existência apenas de uma espécie, *Tursiops truncatus*. Populações costeiras podem realizar grandes deslocamentos, de até 670 km (WELLS et al.,

1990). Em regiões oceânicas, os movimentos podem chegar a 4.200 km (WELLS et al., 1999).

No Brasil, a espécie está distribuída de forma contínua ao longo da costa de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde o ecótipo costeiro forma populações residentes em quatro diferentes sistemas estuarinos, desde Laguna, SC, até a Lagoa dos Patos, RS (SIMÕES-LOPES & FABIÁN, 1999; FRUET et al., 2011), sendo estas as mais conhecidas em todo o Atlântico Sul Ocidental. Contudo, está presente em todo o litoral brasileiro, o que pode ser evidenciado principalmente pela ocorrência de animais mortos nas praias e de registros pontuais de animais vivos. Por meio da fotoidentificação, já foram descritos movimentos de indivíduos do ecótipo costeiro a uma distância de até 314 km, entre o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (MOLLER et al., 1994; SIMÕES-LOPES & FABIÁN, 1999).

No litoral do Rio de Janeiro, já foi registrado o deslocamento de oito indivíduos por uma distância de 100 km ao longo da costa (LODI et al., 2008). Em Florianópolis (SC), também há registros de grupos com até 200 indivíduos próximos à costa (WEDEKIN et al., 2008). Para a região oceânica, há registros pontuais de ocorrência da espécie, não havendo informações disponíveis sobre os padrões de distribuição e movimento destas populações (BARACHO et al., 2007; CREMER et al., 2009; CARVALHO & ROSSI-SANTOS, 2010; WEDEKIN et al., 2014).

Baleia-jubarte, Megaptera novaeangliae

Foram realizadas 18 tentativas de marcação de *Megaptera novaeangliae*, sendo 11 na 2ª Campanha, quatro na 4ª Campanha e três na 5ª Campanha. Em 12 ocasiões não houve condições de realizar o procedimento devido ao comportamento do animal, havendo a perda de três transmissores implantáveis durante procedimentos de marcação da 5ª Campanha. Em todas as ocasiões foram utilizados transmissores na configuração implantável.

No total, foram marcados seis indivíduos da espécie, todos no inverno, sendo essa a segunda espécie com maior número de indivíduos marcados. Foi também a segunda espécie com maior duração das transmissões, chegando a

54 dias de monitoramento. Houve grande variabilidade nos movimentos e uso de habitat da espécie na Bacia de Santos (**Figura V.2-21** e **Figura V.2-22**). Para dois indivíduos, foi possível registrar a rota migratória em direção ao sul, sendo um deles subadulto, sem sexo confirmado por falta de biópsia deste indivíduo, e o outro um indivíduo adulto macho. Um terceiro indivíduo, marcado no mesmo período em 2016, possivelmente também estava em rota migratória em direção ao sul, o que não pode ser confirmado devido ao reduzido tempo de transmissão.

A profundidade máxima das áreas de ocorrência da espécie foi de 5.438 metros e distância da costa de 1.610,1 km. A distância média percorrida foi de 1.673 km, chegando a um máximo de 5.163 km (**Tabela V.2-5**), percorrendo até 95,6 km/dia (**Tabela V.2-4**).

Outro aspecto que se destacou foi a permanência de *Megaptera novaeangliae* em áreas rasas do litoral norte catarinense, evento registrado entre o inverno e a primavera de 2016. Eram animais subadultos, que estavam se alimentando na área, e este padrão comportamental pode ser considerado atípico para a espécie. Um desses era macho, com tamanho estimado em 13 m de comprimento, e o outro uma fêmea, com tamanho estimado em 11 m de comprimento.

A baleia-jubarte (*M. novaeangliae*) é uma das espécies de mysticetos mais bem estudada no mundo, restando contudo muitas lacunas de informação sobre sua ecologia no Hemisfério Sul (IWC, 2006). A IWC denomina como “Estoque reprodutivo A” a população que migra anualmente para a costa leste da América do Sul (IWC, 2005). A região do Banco de Abrolhos, no litoral do Brasil, é a principal área de reprodução desse estoque (ANDRIOLO et al., 2006; WEDEKIN et al., 2010).

A abundância relativa na região aumenta gradualmente depois de julho, atingindo um pico entre o final de agosto e início de setembro, e reduzindo novamente em novembro, quando a população retorna para as áreas de alimentação (MORETE et al., 2008). A rota migratória dessa população indica que as Ilhas Sanduíche e as Ilhas da Geórgia do Sul são a principal região de alimentação desse estoque (ZERBINI et al., 2006; ENGEL & MARTIN, 2009).

A rota percorrida pelos indivíduos PTT 158553 (agosto/2016) e PTT 34588 (macho – agosto/2017) seguiu o “corredor migratório” dessa população, sendo semelhante às rotas registradas por ZERBINI et al. (2006) para uma fêmea acompanhada por filhote e um macho de *Megaptera novaeangliae*, marcados com transmissor satelital em 2003. Contudo, pode-se considerar que a migração desses indivíduos para a região de alimentação ocorreu antes do previsto, já que tal movimento costuma ocorrer entre outubro e novembro, após a temporada reprodutiva (ZERBINI et al., 2006; MORETE et al., 2008).

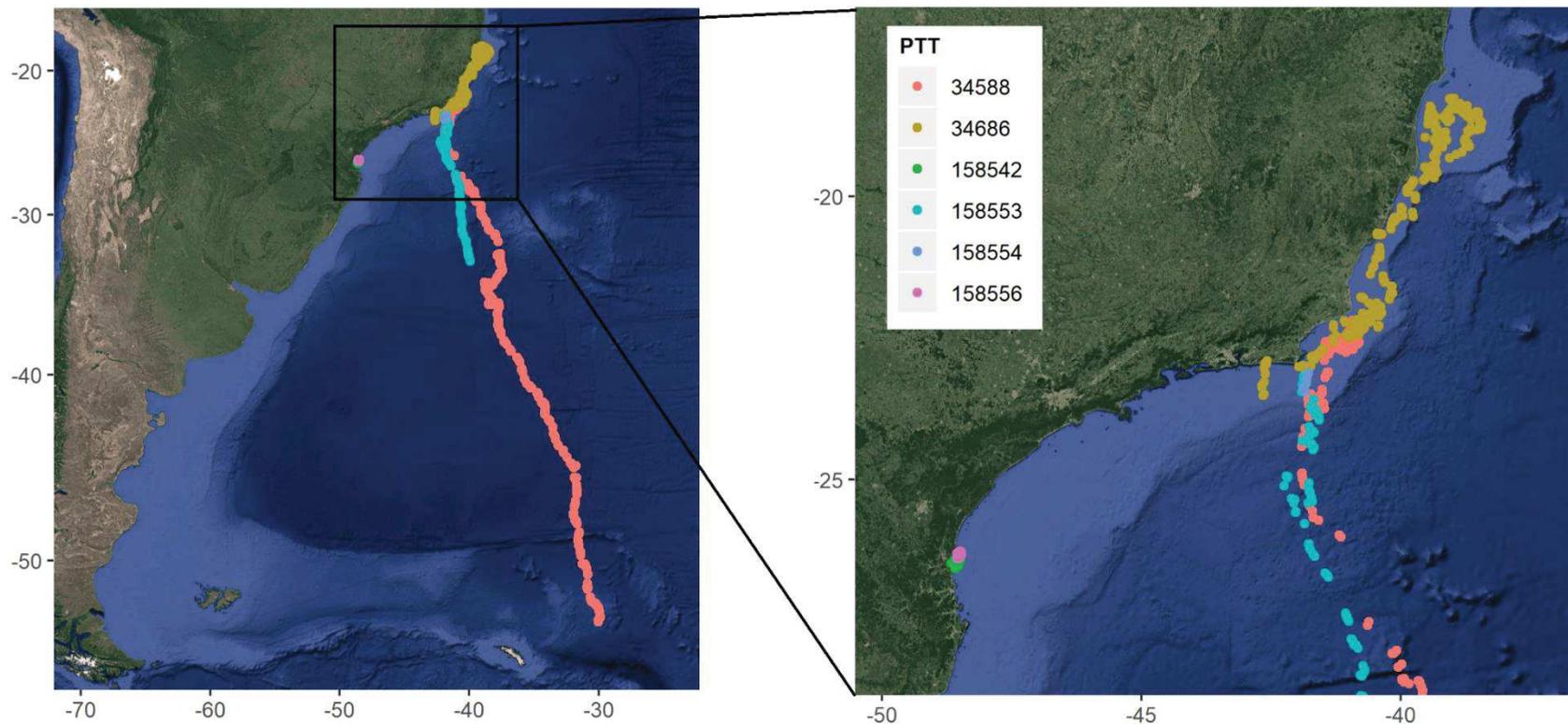


Figura V.2-21: Movimentação das baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

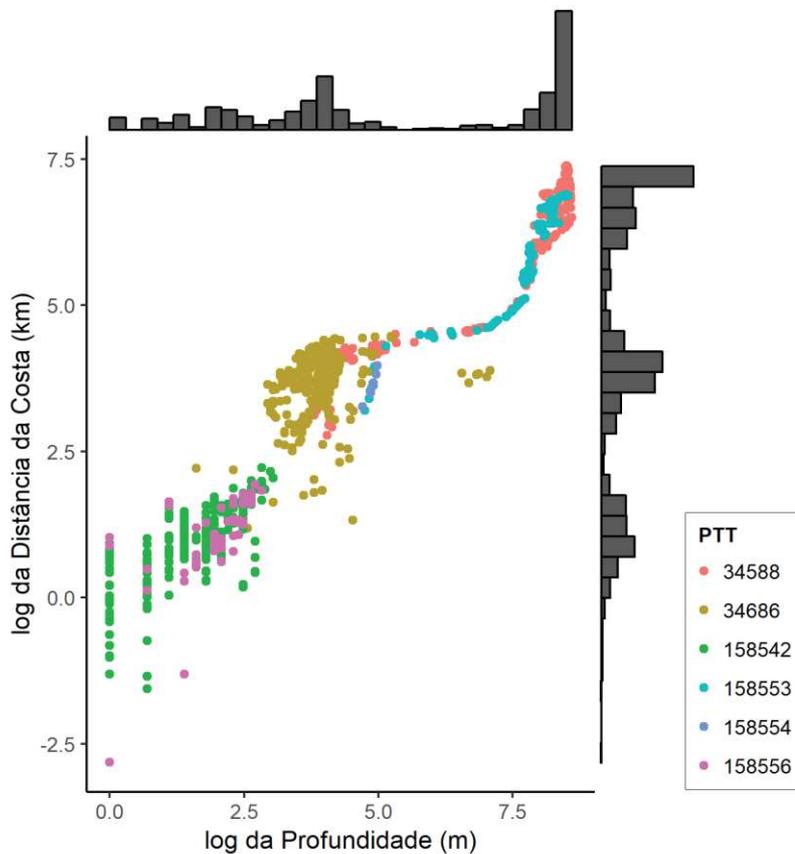


Figura V.2-22: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) das baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos

O primeiro indivíduo era um subadulto, o que pode explicar esse retorno precoce às áreas de alimentação, já que nessa fase da vida os indivíduos ainda não estão envolvidos diretamente nas atividades reprodutivas. Contudo, o animal marcado em 2017 era um macho adulto. Neste caso, o retorno precoce às áreas de alimentação pode estar associado a necessidades nutricionais. Entretanto, deve-se considerar que existe variação no comportamento migratório relacionada ao sexo e estado reprodutivo (BROWN et al., 1995), e essa variação individual ainda precisa ser descrita para a costa brasileira.

O comportamento dos indivíduos PTT 158543 e PTT 158546 pode ser considerado atípico para a espécie na costa brasileira. Não há registros pretéritos de áreas de concentração de baleias-jubarte ao longo do litoral sul do Brasil. Encalhes de animais mortos são documentados há vários anos na região Sul (PINEDO, 1985; CHEREM et al., 2004), mas são raros os registros de animais vivos ao longo da costa, incluindo o litoral catarinense. É possível que o aumento populacional da espécie nos últimos anos esteja ocasionando uma maior dispersão da população, que passa a ocupar novas áreas. O fato destes animais serem jovens também contribui para explicar sua permanência numa região que normalmente não é utilizada pela espécie. Alguns autores sugerem que a espécie se alimenta de forma oportunista durante a migração para áreas de reprodução (SILVA et al., 2012; WITTEWEEN et al., 2011).

Orca, Orcinus orca

Foram marcadas até o momento quatro orcas no inverno, com dados para dois machos adultos em águas oceânicas e um macho na região costeira. Todos foram marcados com transmissores na configuração LIMPET, com seis pétalas (**Tabela V.2-4**).

Os indivíduos marcados na região do talude transmitiram somente 3 e 13 dias (PTT 158547 e PTT 162628), usando águas entre 150 e 1.140 metros de profundidade e distantes no máximo a 198,5 km da costa (**Tabela V.2-5**). O animal marcado nas águas costeiras do Estado de Santa Catarina (PTT 162633) deslocou-se em direção ao sul paralelamente à costa e chegou até regiões na boca do estuário do rio da Prata, entre o Uruguai e a Argentina. Esse indivíduo teve um padrão de movimentação e uso de habitat bastante distinto dos outros indivíduos marcados, movendo-se principalmente entre as isóbatas de 10 e 50 metros de profundidade (**Figura V.2-23 e Figura V.2-24**), percorrendo 2.692,5 km, com média de 81,6 km/dia (**Tabela V.2-4**).

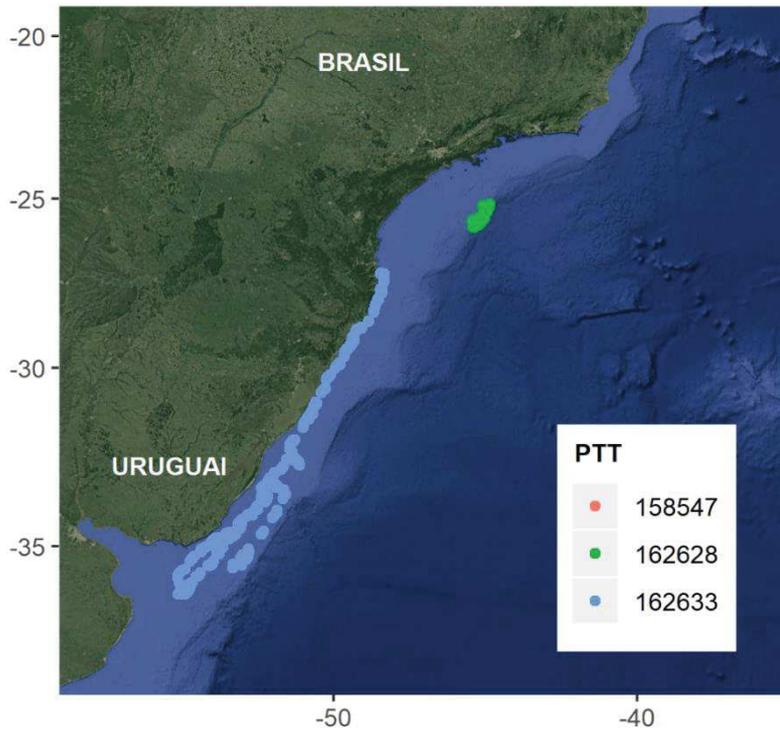


Figura V.2-23: Movimentação das orcas (*Orcinus orca*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

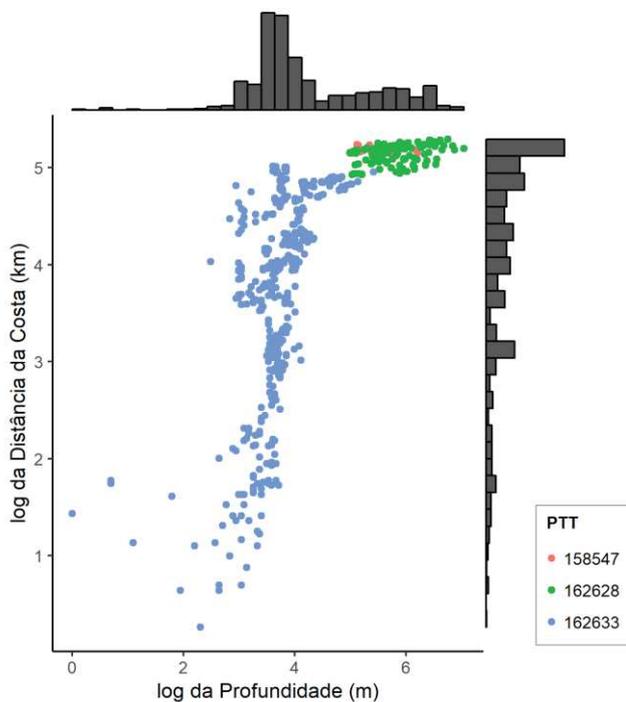


Figura V.2-24: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) dos indivíduos de *Orcinus orca* marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

Há registros ocasionais de indivíduos solitários ou grupos de tamanho variado, chegando a 10 indivíduos, no litoral dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, em todas as estações (LODI & HETZEL, 1998; SICILIANO et al., 1999; SANTOS & SILVA, 2009; SANTOS et al., 2010; LODI & FARIAS-JÚNIOR, 2011). Um indivíduo solitário foi reavistado nesta região em todas as estações, mas principalmente no verão (LODI & FARIAS-JÚNIOR, 2011). DI TULLIO et al. (2016) registraram apenas dois grupos de orcas na região do talude da Bacia de Santos, ambos no outono, enquanto WEDEKIN et al. (2014) registraram dois indivíduos no Banco de Vitória, a sudeste do Banco de Abrolhos, no inverno. Em outras regiões, a espécie é conhecida por realizar grandes movimentos, de até 15.600 km (GOLEY & STRALEY, 1994; MATKIN et al., 1997; VISSER, 1999).

Baleia-sei, Balaenoptera borealis

Foram realizadas oito tentativas de marcação de baleias-sei (*Balaenoptera borealis*), todas na 2ª Campanha, realizada no inverno. Em duas ocasiões, não houve condições de realizar o procedimento devido ao comportamento do animal e, em uma ocasião, houve falha na instalação, com a perda do transmissor. Em cinco oportunidades, houve sucesso na marcação, sendo obtidas informações para três animais, todos marcados com transmissores na configuração LIMPET. Desses, apenas um teve a coleta de biópsia. Apenas um transmissor na configuração implantável foi utilizado para esta espécie, mas houve falha na transmissão de dados. Todos os indivíduos foram marcados na região do talude continental (**Figura V.2-25**).

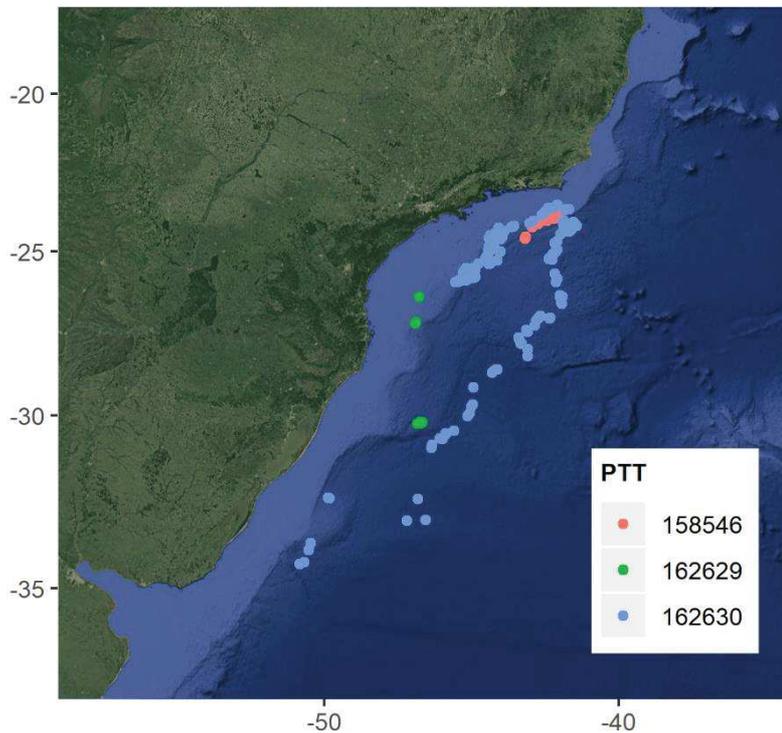


Figura V.2-25: Movimentação das três baleias-sei (*Balaenoptera borealis*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

Um dos indivíduos (PTT 162630), cujo transmissor permaneceu ativo por 38 dias, movimentou-se pelo talude da Bacia de Santos dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Após permanecer por alguns dias no talude, o animal iniciou um deslocamento para águas oceânicas em direção sudoeste até uma região no talude continental do Uruguai, onde parou de transmitir, percorrendo 3.533,1 km, a 92,9 km/dia (**Tabela V.2-4**). Para os outros dois indivíduos, o tempo reduzido de permanência dos transmissores não permitiu confirmar a continuidade do movimento em direção ao sul. O indivíduo PTT 162629, marcado num grupo com 3 indivíduos adultos a uma distância de 170 km da costa, foi o único com o sexo definido geneticamente por meio de biópsia, identificado como um macho.

As baleias-sei ocorreram em regiões com profundidade média de 1.328 ± 928 metros, a uma distância média da costa de $185,5 \pm 99,8$ km (**Tabela V.2-5**, **Figura V.2-26**).

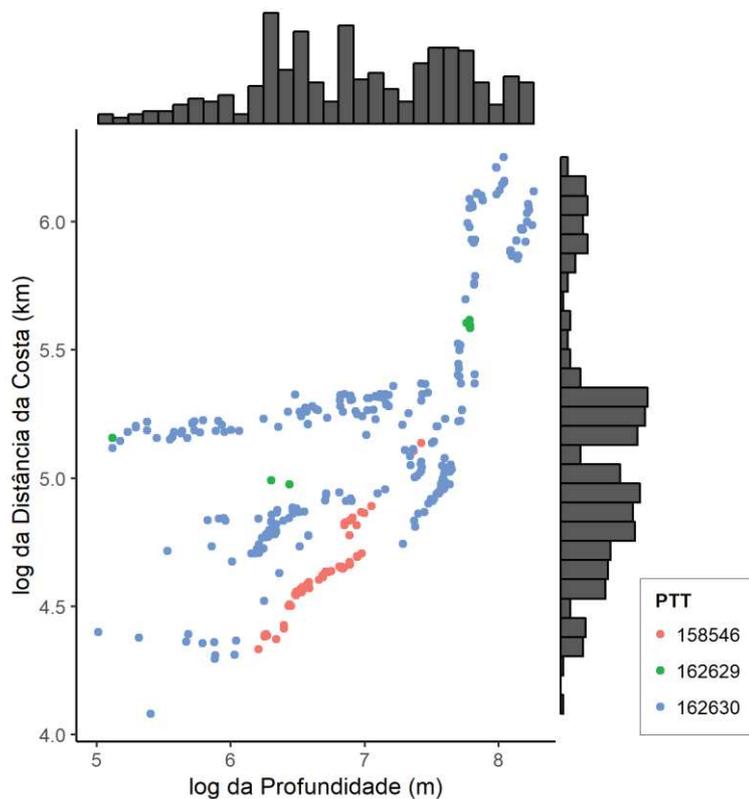


Figura V.2-26: Descritores de habitat (profundidade e distância da costa) das três baleias-sei (*Balaenoptera borealis*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

Os dados aqui apresentados sobre *B. borealis* são muito relevantes, dada a escassez de informações sobre a espécie no Atlântico Sul (PRIETO, 2014). Além disso, o uso de telemetria via satélite (OLSEN et al., 2009; PRIETO et al., 2014) para descrever padrões de deslocamento desta espécie ainda é incipiente. A presença da baleia-sei no Brasil é considerada ocasional (LODI & BOROBIA, 2013) e nada se conhece sobre sua estrutura genética, seus movimentos e padrão de migração nessa região do Atlântico. A espécie foi abundante nos registros de capturas em Costinha, na Paraíba, entre 1947 e 1974 (ver ZERBINI et al., 1997). Contudo, levantamentos realizados nessa antiga área de caça na região da Paraíba, no período de 1998 a 2001, registraram apenas dois indivíduos (ANDRIOLO et al., 2010). Os dados indicam que a espécie sofreu uma redução significativa, com a população

original estimada em 100.000 indivíduos em 1930, sendo reduzida para aproximadamente 16.000 indivíduos em 1979 (HORWOOD, 1987).

DI TULLIO et al. (2016) registraram apenas um indivíduo na região Sul, na primavera, após realizarem oito cruzeiros na região do talude continental entre os anos de 2009 e 2014, ao longo das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Os três indivíduos marcados no presente trabalho tiveram seus movimentos monitorados no mês de agosto (inverno) e seu deslocamento em direção ao sul pode indicar uma migração de retorno para as áreas de alimentação, em latitudes mais altas, onde a espécie provavelmente ocorre entre a primavera e o verão.

A baleia-sei realiza migrações latitudinais, como a maioria dos mysticetos (WEIR et al., 2001; JEFFERSON et al., 2015), permanecendo no verão em altas latitudes para alimentação e no inverno em baixas latitudes para reprodução (HORWOOD, 1987). Enquanto as áreas de alimentação são bem conhecidas, as áreas de reprodução permanecem pouco definidas (PRIETO, 2014). A espécie costuma ocupar a região oceânica, mas pode se aproximar da costa para se alimentar (SHILLING et al., 1992).

O único trabalho realizado até o momento usando telemetria satelital com essa espécie ocorreu no Atlântico Norte e registrou uma migração de 4.102 km de distância na primavera, entre a Ilha Faial (Açores) e as águas produtivas do mar de Labrador, num intervalo de 43 dias (OLSEN et al., 2009). A distribuição das baleias-sei está estreitamente associada a características oceanográficas, tanto físicas como biológicas, durante a sua migração para as latitudes maiores, onde estão suas áreas de alimentação (SKOV et al., 2008; OLSEN et al., 2009).

*Golfinho-cabeça-de-melão, *Peponocephala electra**

O primeiro registro da espécie nas campanhas de telemetria ocorreu em abril de 2018, quando foram marcados dois indivíduos da espécie, ambos num grupo de 296 indivíduos registrado na região oceânica, com transmissores na configuração LIMPET. Essa foi a menor espécie marcada com transmissor satelital, apresentando também a menor duração média de transmissão

(menos que 7 dias). Os dois indivíduos marcados na Bacia de Santos permaneceram na mesma região do talude continental onde foram marcados ao largo do Estado do Rio de Janeiro (**Figura V.2-27**).

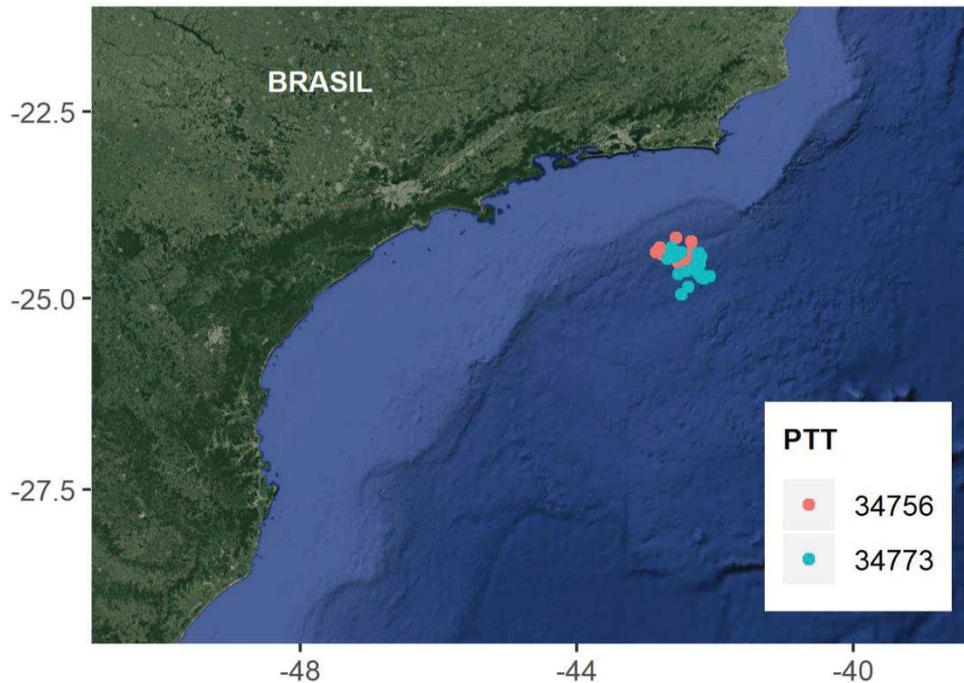


Figura V.2-27: Movimentação dos golfinhos-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

Ambos foram monitorados por um período semelhante, percorrendo 238,8 e 267,5 km cada, o que indica que tenham permanecido no mesmo grupo durante o período de 6 e 7 dias de monitoramento (**Tabela V.2-4**). Os indivíduos permaneceram numa região com profundidade média de $1.834 \pm 285,8$ metros, a $171,2 \pm 17,3$ km da costa (**Tabela V.2-5**).

O golfinho-cabeça-de-melão é uma espécie que ocorre em regiões de águas profundas dos mares tropicais e subtropicais (JEFFERSON *et al.*, 2008). A espécie é muito social e costuma formar grandes grupos, com dezenas de indivíduos. No Atlântico Sul, os registros são muito ocasionais e restritos ao encalhe de animais no litoral da região Nordeste e norte da região Sudeste

(GASPARINI & SAZIMA, 1996; MOTTA & SILVA, 2005), incluindo um encalhe em massa ocorrido na Bahia (LODI et al., 1990).

A população mais conhecida de golfinhos-cabeça-de-melão é a que ocorre na região do Hawai, onde uma população com mais de 5.000 indivíduos ocupa a região das ilhas e áreas mais afastadas, e outra população residente com cerca de 450 indivíduos ocorre junto a ilha do Hawai (ASCHETTINO et al., 2011). No Hawai, a profundidade média de permanência de um indivíduo da população mais oceânica foi de 3.397 metros, enquanto dois indivíduos da população residente permaneceram em áreas com 437 a 621 metros de profundidade (WEST et al., 2018). O mais amplo estudo sobre padrões de movimento da espécie foi realizado no Hawai, onde dez indivíduos foram monitorados por períodos de 7 a 24 dias (WOODWORTH et al., 2012). Os movimentos da espécie na região oceânica indicam que ela seleciona áreas de convergência de redemoinhos ciclônicos e anticiclônicos, provavelmente com fins de alimentação.

Embora o período de monitoramento deste estudo tenha sido reduzido, os dados indicam que os indivíduos permaneceram no mesmo grupo e não se afastaram da área, mantendo-se na região do talude, onde dados de mergulho indicam que estes se alimentavam.

*Cachalote, *Physeter macrocephalus**

Foram realizadas nove tentativas de marcação de cachalotes, na 5ª e 6ª Campanhas. Na 5ª Campanha, cinco indivíduos foram marcados num grupo com cerca de 50 indivíduos, dois com transmissores na configuração LIMPET e três implantáveis, mas três transmitiram por pouco tempo ou apresentaram alguma falha e apenas para dois indivíduos os dados obtidos permitiram uma análise mais detalhada. Na 6ª Campanha foram feitas três tentativas de marcação sem sucesso.

Um dos indivíduos, marcado com transmissor na configuração implantável, teve o maior período de monitoramento por telemetria satelital do PMC-BS, chegando a 60 dias. O outro foi marcado com um LIMPET, com duração de 5 dias. Os dois indivíduos permaneceram na região do talude continental,

utilizando águas profundas entre 697 e 2.883 metros de profundidade (**Tabela V.2-5**). O animal que permaneceu mais tempo com o transmissor se deslocou para o sul, sempre na região do talude continental, saindo da Bacia de Santos e deslocando-se até a região limítrofe entre Brasil e Uruguai (**Figura V.2-28**), percorrendo 3.786,1 km a uma velocidade média de 63,1 km/dia (**Tabela V.2-4**).

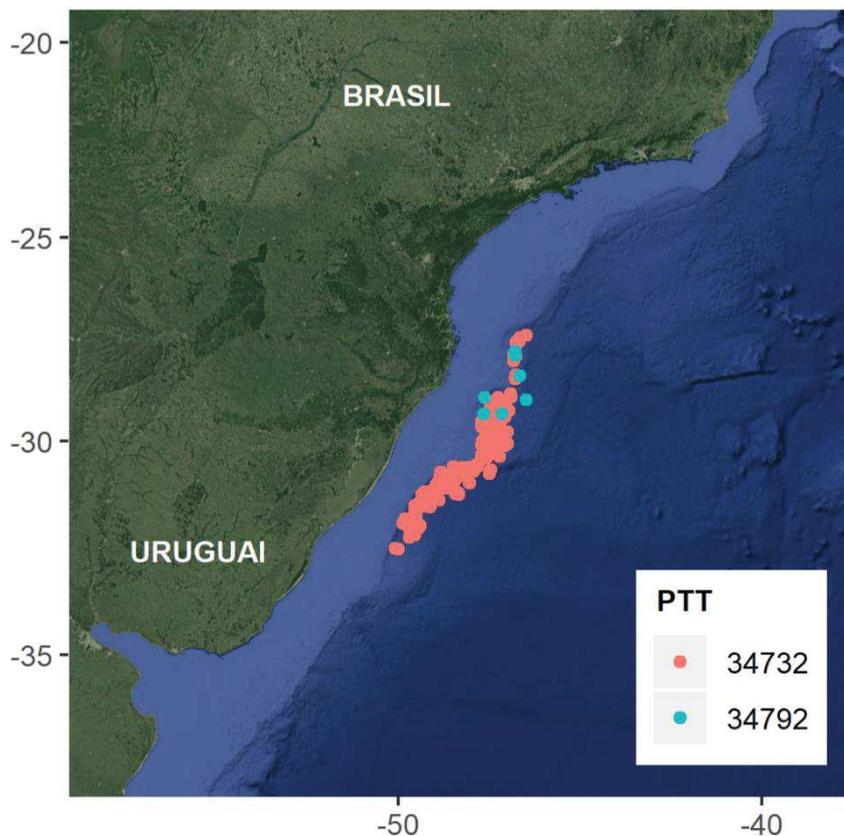


Figura V.2-28: *Movimentação dos cachalotes (*Physeter macrocephalus*) marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.*

São escassas as informações sobre os movimentos e padrões de uso de habitat de cachalotes no Atlântico Sul. A maior parte das informações provém do registro de animais encalhados. Contudo, a espécie representou 27,8% dos registros na região do talude continental entre o Sul e Sudeste do Brasil (DI TULLIO et al., 2016), com maior concentração nas latitudes maiores, ao sul do

Cabo de Santa Marta. A espécie foi registrada em todas as estações, sempre em profundidades maiores que 1.000 metros. Não há registros sobre padrões de uso de habitat e movimento de cachalotes.

Os cachalotes são cosmopolitas e ocorrem em regiões de águas profundas, associadas a cânions ou ao talude continental (JEFFERSON et al., 2008). São reprodutores sazonais, formando agregações com padrões de residência sazonal em regiões de latitudes menores (CHILDERHOUSE et al., 1995; DROUOT-DULAU & GANNIER, 2007; LETEVALL et al., 2016). As fêmeas tendem a formar grupos mais estáveis, enquanto os machos permanecem a maior parte do tempo solitários, percorrendo longas distâncias (JEFFERSON et al., 2008).

Baleia-de-Bryde, Balaenoptera brydei

Foram marcadas duas baleias-de-Bryde com transmissores na configuração LIMPET, com seis pétalas, nos dias 25/07/17 (4ª Campanha) e 13/11/17 (5ª Campanha). Dezoito tentativas de marcação da espécie com transmissores satelitais foram realizadas ao longo de três anos, sendo oito na configuração implantável e dez com transmissores na configuração LIMPET. Em quinze tentativas, não houve condições de realizar o procedimento devido ao comportamento do animal e, em duas ocasiões, houve falha na instalação, com a perda do transmissor. Não foi possível a coleta de biópsia dos animais marcados.

O primeiro indivíduo foi marcado próximo a Ilhabela (SP) e tinha uma cicatriz profunda no dorso, provavelmente originada pela colisão com um navio de grande porte. O monitoramento durou 28 dias, período no qual o PTT 166662 percorreu 1.111,1 km, a uma velocidade média de 39,7 km/dia (**Tabela V.2-4**). O animal permaneceu por 12 dias junto à Baía do Sombrio, deslocando-se depois pela plataforma continental, atingindo regiões mais profundas (até mais de 600 metros de profundidade) e afastadas da costa (quase 130 m) (**Figura V.2-30**). A baleia marcada na 5ª Campanha era uma fêmea e transmitiu apenas durante 2 dias, percorrendo 34 km nas proximidades de

Cabo Frio. Os indivíduos permaneceram em regiões com profundidade média de 75 ± 123 m, chegando a áreas com 605 metros (**Tabela V.2-5**). Mantiveram-se mais próximo da costa, a $27,9 \pm 42,8$ km em média.

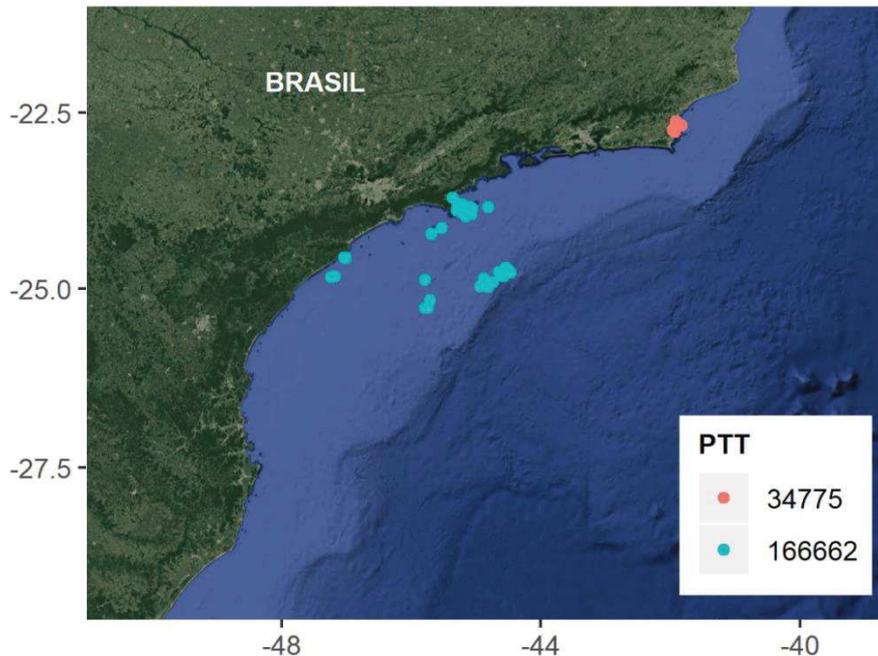


Figura V.2-29: Movimentação das duas baleias-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*) marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos ao longo de três anos.

A baleia-de-Bryde não é uma espécie migratória e as evidências indicam que a espécie permanece em águas tropicais e temperadas ao longo do ano (KATO & PERRIN, 2008). A espécie já foi registrada na costa Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil e há evidências de que as águas brasileiras sejam utilizadas tanto para reprodução como para alimentação (SICILIANO et al., 2004; LIMA et al., 2006; ANDRIOLO et al., 2010). Em Costinha, Paraíba, a espécie foi alvo da caça entre os anos 1940 e 1970 (WILLIAMSON, 1975; DA ROCHA, 1984), embora não fosse considerada abundante nessa região. Registros mais recentes na costa Nordeste são raros e reportam animais tanto na região costeira como oceânica (ANDRIOLO et al., 2010). Em cruzeiros realizados no talude das regiões Sul e Sudeste, a espécie foi frequente no Sudeste (DI TULLIO et al., 2016).

Embora seja escasso o conhecimento sobre a espécie no Brasil, duas áreas de maior concentração são conhecidas no Sudeste: Cabo Frio (RJ) (SICILIANO et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2015) e a Laje de Santos (SP) (GONÇALVES & ANDRIOLO, 2006), com registros ao longo de todo o ano. Algumas evidências sugerem que os indivíduos têm fidelidade a alguns locais (FIGUEIREDO et al., 2015).

Baleia-minke-Antártica, Balaenoptera bonaerensis

Foram realizadas duas tentativas de marcação de baleia-minke-Antártica com transmissores na configuração LIMPET, com seis pétalas, ao longo de três anos (4^a e 5^a Campanha). Apenas uma tentativa teve sucesso, com a marcação de um indivíduo na 4^a Campanha na costa de São Paulo.

A baleia marcada (PTT 166666) era um macho que estava acompanhado de uma fêmea com filhote. O movimento desse indivíduo indica um comportamento migratório, sendo que o animal estava em águas oceânicas da Bahia quando o transmissor parou seu funcionamento (**Figura V.2-30**). Permaneceu em regiões com profundidade variada, de 85 a 4.160 m (1.092 ± 1.055 m), a uma distância média de $104,2 \pm 43,5$ km (**Tabela V.2-6**).

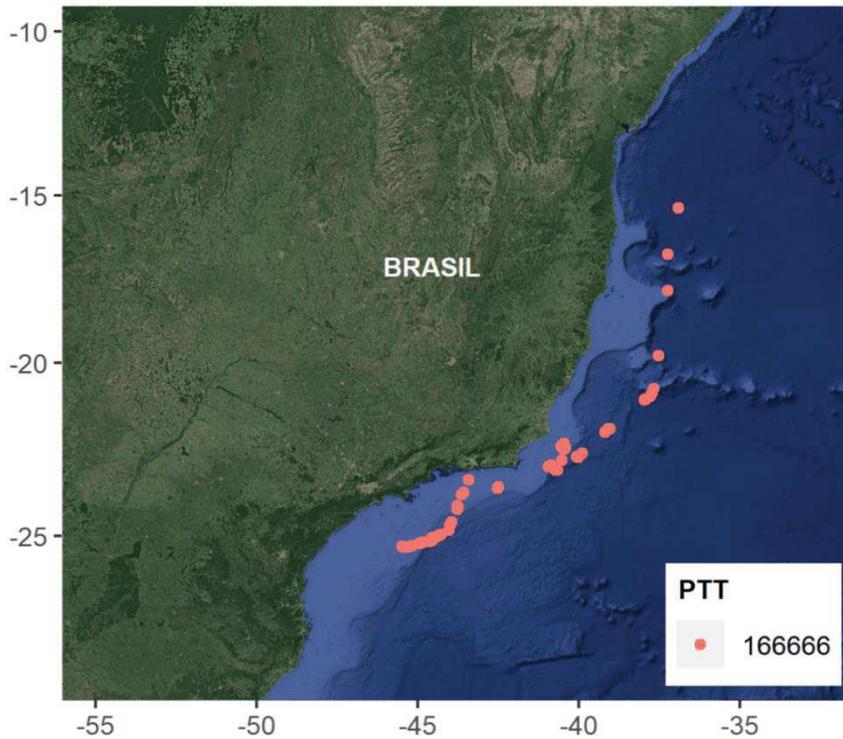


Figura V.2-30: *Movimentação da baleia-minke-Antártica (Balaenoptera bonaerensis) marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos ao longo de três anos.*

A baleia-minke-Antártica está distribuída no Hemisfério Sul e a região Nordeste do Brasil é considerada uma área reprodutiva da espécie (LUCENA, 2006; ANDRIOLO et al., 2010). Em Costinha, na Paraíba, cerca de 10.886 indivíduos foram capturados entre os anos 1960 e 1980, antes da moratória de caça (LUCENA, 2006). Nessa região, a espécie foi registrada em águas oceânicas, entre 200 e 4.675 m de profundidade, com maior concentração em torno de 1.000 m de profundidade e nos meses de agosto a outubro (ANDRIOLO et al., 2010). A espécie também já foi registrada na região Norte do Brasil (Pará) (SICILIANO et al., 2008; BALENSIEFER et al., 2014). No talude da região Sul e Sudeste, a espécie foi registrada em todas as estações, embora tenha sido rara (DI TULLIO et al., 2016).

O reduzido número de filhotes e fêmeas prenhes ou amamentando na costa Nordeste sugere que esta região seja utilizada apenas para o acasalamento, com os nascimentos ocorrendo em latitudes maiores (LUCENA,

2006). Os meses de setembro e outubro foram aqueles de maior abundância de baleias na época da caça, sendo esse o período de ovulações eminentes na região (ROCHA & BRAGA, 1982).

O movimento do indivíduo PTT 166666 seguiu o padrão esperado, pois ao final de julho estava em águas oceânicas ao largo do Estado da Bahia. Essa foi a primeira marcação da espécie com transmissor satelital no Atlântico Sul.

Baleia-fin, Balaenoptera physalus

Foram realizadas sete tentativas de marcação de baleias-fin (*Balaenoptera physalus*), sendo uma na 2ª Campanha de Avistagem e MAP, uma na 2ª Campanha de Telemetria e as outras cinco na 4ª Campanha de Telemetria. Em três ocasiões, não houve condições de realizar o procedimento devido ao comportamento do animal e, em outras três ocasiões, houve falha na instalação, com a perda do transmissor. Apenas uma baleia foi marcada com sucesso na 2ª Campanha utilizando um transmissor na configuração LIMPET, sem a coleta de biópsia. O animal estava a cerca de 150 km da costa e 686 m de profundidade. Não foi possível obter informações sobre os padrões de movimentação desta espécie devido ao reduzido tempo de permanência do transmissor. Não houve novas oportunidades de marcação no terceiro ano.

Considerações sobre espécies-alvo da telemetria satelital

Foram definidas inicialmente quatro espécies-alvo para o trabalho com telemetria satelital do PMC-BS, conforme previsto no Projeto Executivo, sendo três espécies de grande porte (baleia-de-Bryde, *B. brydei*; baleia-jubarte, *M. novaeangliae*; e cachalote, *P. macrocephalus*) e uma espécie de médio porte (a orca, *O. orca*).

Após o primeiro ano de execução do projeto, foi possível constatar que algumas espécies consideradas alvo no projeto executivo tiveram uma abundância reduzida (p.ex., *Orcinus orca*), demonstraram um comportamento que não favoreceu a marcação (p.ex., *Balaenoptera brydei*) ou até mesmo não foram registradas durante os cruzeiros de telemetria (*Physeter macrocephalus*), reduzindo substancialmente o sucesso na colocação dos transmissores nestas

espécies. Neste sentido, foram incorporadas mais duas espécies, consideradas promissoras para a colocação de transmissores: o golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) e a baleia-sei (*B. borealis*). Para a análise dos dados de telemetria satelital, é importante obter informações de um número significativo de indivíduos (amostra) de cada espécie para definir padrões que permitam comparações futuras na análise de possíveis impactos causados pelas atividades do polo pré-sal da Bacia de Santos. O projeto tem atualmente seis espécies como alvo da telemetria, pertencentes a duas subordens e três famílias (**Tabela V.2-6**). No segundo ano do projeto, houve a primeira marcação de uma *Balaenoptera brydei*, assim como de duas *Megaptera novaeangliae*, uma *Orcinus orca* e quatro *Tursiops truncatus*. No terceiro ano, foram marcados *Physeter mcarocephalus*.

Considerando a meta de instalação de 25 transmissores satelitais ao ano, segundo o previsto no Projeto Executivo que seguiu o definido no Projeto Conceitual (Proposta Técnica), e as baixas taxas de encontro de cetáceos de maneira geral, deu-se continuidade à proposta inicial de marcar todas as espécies com potencial de marcação.

M. novaeangliae é a espécie para a qual existe um maior conjunto de informações sobre seus padrões de movimentação na Bacia de Santos e, portanto, é a espécie com maior potencial de resposta para as questões propostas para o PMC-BS no âmbito da telemetria satelital. Tem um corredor de migração conhecido na região oceânica, com aproximação da costa principalmente a partir de Cabo Frio, no Rio de Janeiro (WEDEKIN, 2011). Contudo, mesmo para esta espécie, novas informações foram incorporadas com a marcação de indivíduos junto à costa catarinense, que permaneceram na região por um período prolongado. Esta espécie tem uma sazonalidade marcante que precisa sempre ser levada em consideração nas análises.

Para outras espécies, como *Tursiops truncatus* e *Orcinus orca*, não foram registrados movimentos entre a região costeira e a região oceânica, embora tenham sido registrados e marcados indivíduos em ambas as regiões. É possível que ocorra uma movimentação de indivíduos ao largo da plataforma continental, entre a costa e o talude, não havendo evidências de populações

estritamente oceânicas. A marcação de animais na região oceânica não garante, por si só, a obtenção de respostas às questões propostas no âmbito do PMC-BS. Entende-se que deva ser mantido o esforço tanto na região costeira como na região oceânica.

Ao longo dos dois primeiros anos do PMC-BS, foi possível constatar que, tanto na região costeira como na oceânica, há locais com maiores taxas de encontro de cetáceos. Considerando que o principal objetivo dos cruzeiros de telemetria é a marcação de cetáceos para gerar um conhecimento sobre seus padrões de movimentação na Bacia de Santos, entende-se que seja muito importante manter a estratégia de focar os esforços para os locais com maiores taxas de encontro, aumentando as chances de marcar um maior número de animais. Além disso, o período de realização das campanhas pode ser uma estratégia importante para aumentar as taxas de encontro de grandes cetáceos, mantendo as duas campanhas anuais durante o período migratório de misticetos, ou seja, entre o inverno e a primavera.

Tabela V.2-6: Espécies-alvo da telemetria satelital do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos, número de indivíduos marcados com sucesso a cada ano e características-chave das espécies.

Táxon	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Características
Subordem Mysticeti				
Família Balaenopteridae				
Baleia-de-Bryde, <i>Balaenoptera brydei</i>	0	1	1	Espécie não migratória de grande porte, com ocorrência comprovada tanto na região costeira como oceânica do Brasil;
Baleia-sei, <i>Balaenoptera borealis</i>	2	0	0	Espécie migratória de grande porte, com evidências de ocorrência apenas na região oceânica;
Baleia-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i>	4	2	0	Espécie migratória de grande porte, com ocorrência comprovada tanto na região costeira como oceânica do Brasil.
Subordem Odontoceti				
Família Physeteridae				
Cachalote, <i>Physeter macrocephalus</i>	0	0	2	Espécie de topo de cadeia de grande porte, com ocorrência restrita à região oceânica;
Família Delphinidae				
Orca, <i>Orcinus orca</i>	2	1	0	Espécie de topo de cadeia, de médio porte, com ocorrência comprovada tanto na região costeira como oceânica do Brasil;
Golfinho-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i>	3	4	3	Espécie de elevado nível trófico, de pequeno porte, com ocorrência comprovada tanto na região costeira como oceânica do Brasil.

V.2.1 Movimentos - Fotoidentificação

Ao longo de todos os seis ciclos, ocorreram reavistagens para nove espécies de cetáceos na Bacia de Santos: um de *Balaenoptera borealis*, um de *B. physalus*, três de *B. brydei*, um de *Megaptera novaeangliae*, um de um grupo de *Peponocephala electra* (com reconhecimento de 27 indivíduos nos dois grupos), um de *Sotalia guianensis*, um de *Stenella frontalis*, oito de *Steno bredanensis*, e nove de *Tursiops truncatus*. Assim, no total foram 25 reavistagens de indivíduos e uma de um grupo. Abaixo, por espécie, são apresentados espacialmente os registros de reavistagem entre dados do PMC-BS e em relação a outros catálogos, com discussões.

Reavistagens de *Tursiops truncatus*

O primeiro indivíduo identificado em duas ocasiões (dias) de campo distintas foi um *Tursiops truncatus*, catalogado como 16#. Registrado pela primeira vez no dia 25/02/2016, na 1ª Campanha de Telemetria, foi novamente foto-identificado em 17/03/2016, na mesma campanha. As posições geográficas desses dois registros do indivíduo 16# indicaram um deslocamento mínimo de 100 km ao sul. Nota-se que esses registros ocorreram em um intervalo maior que 20 dias, sendo o primeiro no início da campanha, e o segundo no final da campanha (**Figura V.2-31**).

No 3º ciclo, outras três reavistagens foram realizadas para *Tursiops truncatus*, sendo dois dentro da mesma campanha e um entre campanhas, com intervalo de 1 ano entre eles. Os indivíduos catalogados como 143# e 147# foram registrados no dia 14/02/2017 no mesmo grupo, na 3ª Campanha de Telemetria, e novamente no dia seguinte, aproximadamente 5 km ao sul (**Figura V.2-31**). Esses movimentos observados dentro da mesma campanha sugerem inicialmente um padrão de movimentação da direção norte para o sul, que coincide com os movimentos de indivíduos observados por telemetria satelital. Caso esse padrão de movimento, em termos sazonais e direcionais, se repita em anos seguintes, o mesmo deve indicar um evento condicionado ao movimento de presas específicas. Uma avaliação da sazonalidade e

distribuição de atividades de pesca na área pode contribuir para se apontar qual ou quais presas poderiam estar motivando esses movimentos.

Já o indivíduo 27#, registrado no dia 25/02/2016, na 1º Campanha de Telemetria, foi novamente registrado no dia 14/02/2017, na 3º Campanha de Telemetria, quase um ano depois, aproximadamente 700 km ao norte do primeiro registro (**Figura V.2-31**). Essa reavistagem de *Tursiops truncatus* (27#) pode indicar um momento anterior de um possível padrão de movimento norte-sul que se repete entre anos, já que o registro ocorreu 11 dias antes do registro no ano anterior. Nota-se que ambos os registros ocorreram em áreas costeiras, embora a forma da nadadeira dorsal seja típica de um padrão oceânico (COSTA et al., 2016). Isso sugere que indivíduos oceânicos utilizam áreas costeiras com frequência.

No 4º Ciclo, não foram identificados indivíduos já catalogados. No entanto, por meio de comparação de catálogos, o indivíduo 67#, registrado em 05/03/2016, na 1º Campanha de Telemetria, foi identificado no catálogo do Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro (PBGRJ), com registro de 03/04/2014 (**Figura V.2-31**). Esses registros ocorreram a uma distância de aproximadamente 120 km, próximo à costa do Rio de Janeiro. Esse indivíduo foi registrado em outras 2 oportunidades pelo PBGRJ, sugerindo tratar-se de um indivíduo de uma população transiente e costeira, com algum grau de fidelidade ao Arquipélago das Cagarras (RJ) (LODI et al., 2014).

O segundo registro por comparação de catálogo para *T. truncatus* foi do indivíduo 190#, foto-identificado em 30/01/2017 nas proximidades de Itajaí/SC (**Figura V.2-31**). Este indivíduo é observado sistematicamente desde 2007 pelo projeto de monitoramento da população residente de *T. truncatus* em Laguna/SC, aproximadamente 200 km ao sul, realizado pelo Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina. Este registro do PMC-BS sugere que indivíduos da população de *T. truncatus* residente em Laguna abandonam a área temporariamente. Embora possa ser um movimento ocasional, esta é uma novidade não observada pelos estudos que monitoram continuamente parâmetros populacionais daquela população e sugerem alto grau de residência ao Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos-Imaruí-

Mirim (DAURA-JORGE et al., 2013), e estudos genéticos que sugerem alto grau de isolamento desta população costeira (FRUET et al., 2014).

No 5º Ciclo, foi observado uma nova reavistagem de *Tursiops truncatus* entre Campanhas. O indivíduo 103# foi observado pela primeira vez em 17/08/2016, na 2ª Campanha de Telemetria, e observado novamente em 05/11/2017, na 5ª Campanha de Telemetria (**Figura V.2-31**). Esse mesmo indivíduo já vem sendo registrado nas proximidades do Arquipélago das Cagarras (RJ) desde 2004, pelo Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro (PBGRJ), sendo observado nessa área também em 2015 e 2016.

Ao longo da última comparação de catálogos entre PMC-BS e PBGRJ, dois novos indivíduos (205# e 206#), observados no mesmo grupo do indivíduo 103# na 5ª Campanha de Telemetria, também foram identificados no catálogo do PBGRJ. O indivíduo 205#, entre 2004 e 2016 foi registrado 47 vezes pelo PBGRJ na área, enquanto o indivíduo 206# vem sendo registrado pelo PBGRJ desde 2015. Todos os registros do PMC-BS são em áreas costeiras, próximo ao Arquipélago das Cagarras e Ilha Grande. Estes registros reforçam a proposta de ocorrência de uma população costeira e transiente na área, com algum grau de fidelidade ao Arquipélago das Cagarras e adjacências (LODI et al., 2014; **Figura V.2-31**).

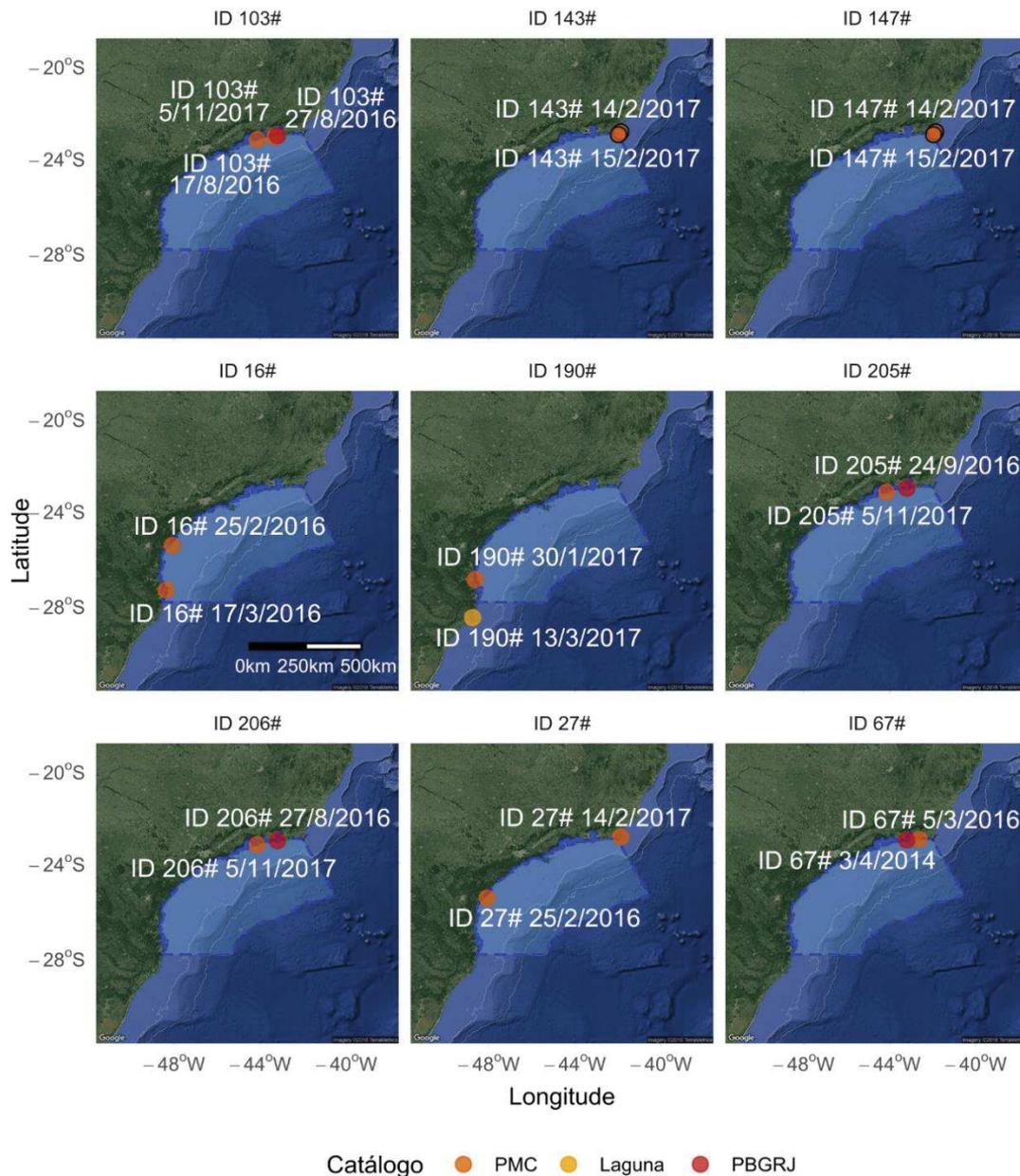


Figura V.2-31: Mapa com as localizações de reavistagens de *Tursiops truncatus*.

Reavistagens de *Steno bredanensis*

Para *Steno bredanensis*, dois indivíduos foram foto-identificados mais de uma vez pelos esforços do PMC-BS. O indivíduo 1# (**Figura V.2-32**), registrado em 02/03/2016 na 1º Campanha de Telemetria, foi novamente registrado em 16/02/2017, na 3º Campanha de Telemetria e em 19/07/2017, na 4º Campanha de Telemetria. Todos esses registros ocorreram em áreas costeiras entre Ilha

Grande e Cabo Frio, litoral do Rio de Janeiro. Adicionalmente, esse indivíduo, desde 2011, compõe o catálogo de foto-identificação do Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, sendo registrado em 5 oportunidades nas proximidades do Arquipélago de Cagarras (RJ). O indivíduo 9#, registrado em 16/02/2017 na 3º Campanha de Telemetria, foi novamente registrado em 28/03/2018, na 6º Campanha de Telemetria. O primeiro registro ocorreu em áreas costeiras, entre Ilha Grande e Cabo Frio, litoral do Rio de Janeiro, enquanto o segundo ocorreu em área oceânica. Esse mesmo indivíduo, desde 2015, compõe o catálogo de foto-identificação do Projeto Baleias e Golfinhos do Rio de Janeiro, sendo registrado em 2 oportunidades nas proximidades do Arquipélago de Cagarras (RJ) (**Figura V.2-32**).

Outros seis registros do PMC-BS, indivíduos 04#, 06#, 10#, 11#, 13# e 14#, também foram observados pelo PBGRJ (**Figura V.2-32**). Esses registros do PMC-BS ocorreram nas proximidades de Ilha Grande (04# e 06#), ou mais ao norte, nas proximidades de Cabo Frio. Pelo PBGRJ, os registros ocorreram nas proximidades do Arquipélago das Cagarras. Além de reforçar a hipótese já proposta de um movimento comum entre essas áreas, aparentemente importantes para atividades de forrageio (LODI et al., 1999), essas reavistagens ocorreram em anos diferentes, sugerindo que esses indivíduos compõem uma unidade populacional costeira e com um possível padrão de residência e/ou fidelidade à área (LODI et al., 2012). Dados futuros ajudarão a elucidar esses padrões.

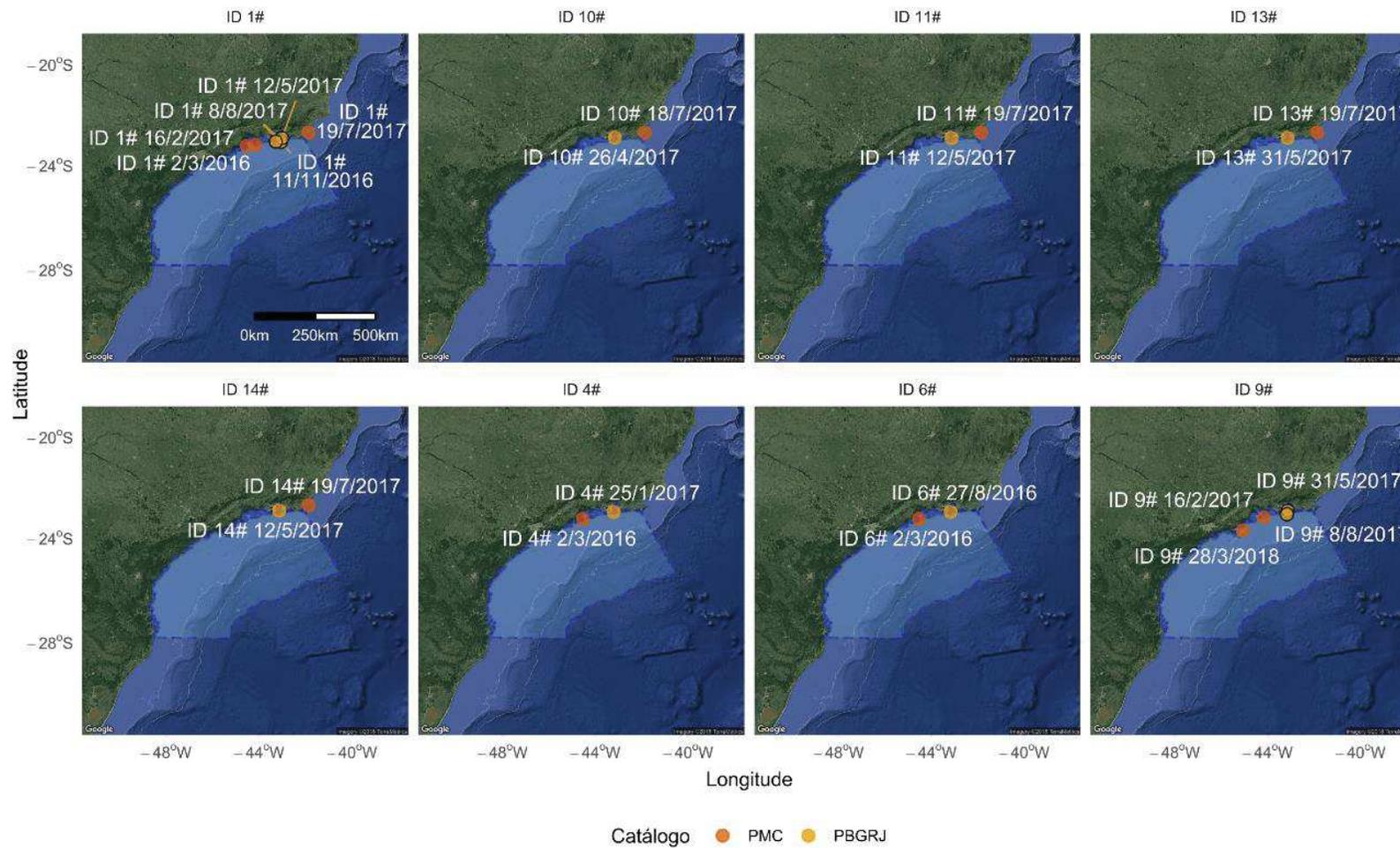


Figura V.2-32: Mapa com as localizações de reavistagens de *Steno bredanensis*.

Reavistagem de Sotalia guianensis

Também foi realizada uma reavistagem de *Sotalia guianensis* na região da Baía da Babitonga. O indivíduo 21# (**Figura V.2-33**) foi registrado em 24/02/2016 na região da Baía da Babitonga, sendo provavelmente um registro procedente da população residente de *Sotalia* na área (HARDT et al., 2010). No entanto, no dia 22/02/2017, o mesmo indivíduo foi observado próximo a Paranaguá, 60 km ao norte ((**Figura V.2-33**)). Este registro sugere que ou indivíduos da população residente de *Sotalia* da Baía da Babitonga se deslocam para áreas adjacentes, ou indivíduos de áreas adjacentes visitam a Baía da Babitonga. Movimentos como esse não foram registrados anteriormente pelos monitoramentos sistemáticos que ocorrem na área (CREMER et al., 2011), e devem ser considerados em estudos futuros que avaliam o estado das populações costeiras da espécie.

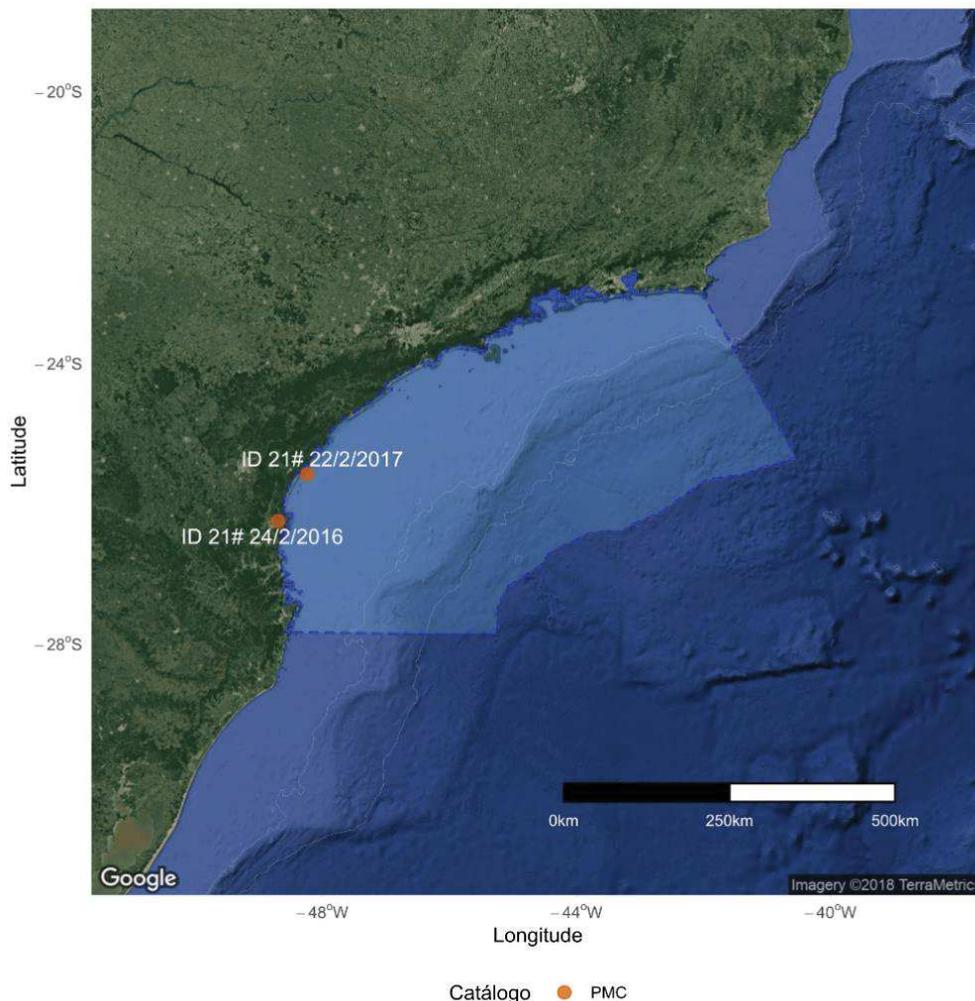


Figura V.2-33: Mapa com as localizações de uma reavistagem de *Sotalia guianensis*.

Reavistagens de *Balaenoptera brydei*

Foram realizadas duas reavistagens de *Balaenoptera brydei* pelo PMC-BS e uma via comparação de catálogos. O indivíduo 03# foi observado na 1ª Campanha de Telemetria em 08/03/2016 nas proximidades do talude e, no ano seguinte, na 4ª Campanha de Avistagem em 14/04/2017, 13 meses depois, foi observado 500 km ao sul, também nas proximidades do Talude (**Figura V.2-34**). O indivíduo 09# também foi observado em duas oportunidades, porém em áreas costeiras, nas proximidades de Ilhabela (SP), com um intervalo de 5 meses entre cada observação, uma ocorrendo no verão e outra no inverno (**Figura V.2-34**). Uma nova reavistagem foi observada comparando os

catálogos de PMC-BS e do PBGRJ. O indivíduo 15#, registrado na 5ª campanha de Telemetria nas proximidades de Ilha Grande (RJ), foi registrado em outras 13 oportunidades na área pelo PBGRJ (**Figura V.2-34**).

A utilização de áreas costeiras na região do Rio de Janeiro e de Cabo Frio em meses quentes já foi previamente documentada e, aparentemente, caracteriza um padrão de fidelidade à área, sendo comum a observação de comportamento de forrageio nesta área de alta produtividade (LODI et al., 2015; MACIEL et al., 2016). Movimentos para áreas costeiras devem ser motivados por movimentos de presas pelágicas potenciais, como sardinhas, *Sardinella brasiliensis*, que, durante o verão e outono, se aproximam da costa para desovar (PAIVA e MOTTA, 2000), e são uma importante presa para *Balaenoptera brydei* (TERSHEY et al., 1993). No entanto, nota-se que três reavistagens do PMC-BS em áreas costeiras foram realizados no início do inverno ou final da primavera, sendo eles períodos em que a área começa a ser menos utilizada e depois começa a ser reutilizada, como observado por Maciel et al. (2016). Já o movimento do indivíduo 03#, ao longo do talude em direção sul, requer mais informações para se concluir se foi um evento ocasional ou um padrão comum de deslocamento para a espécie.

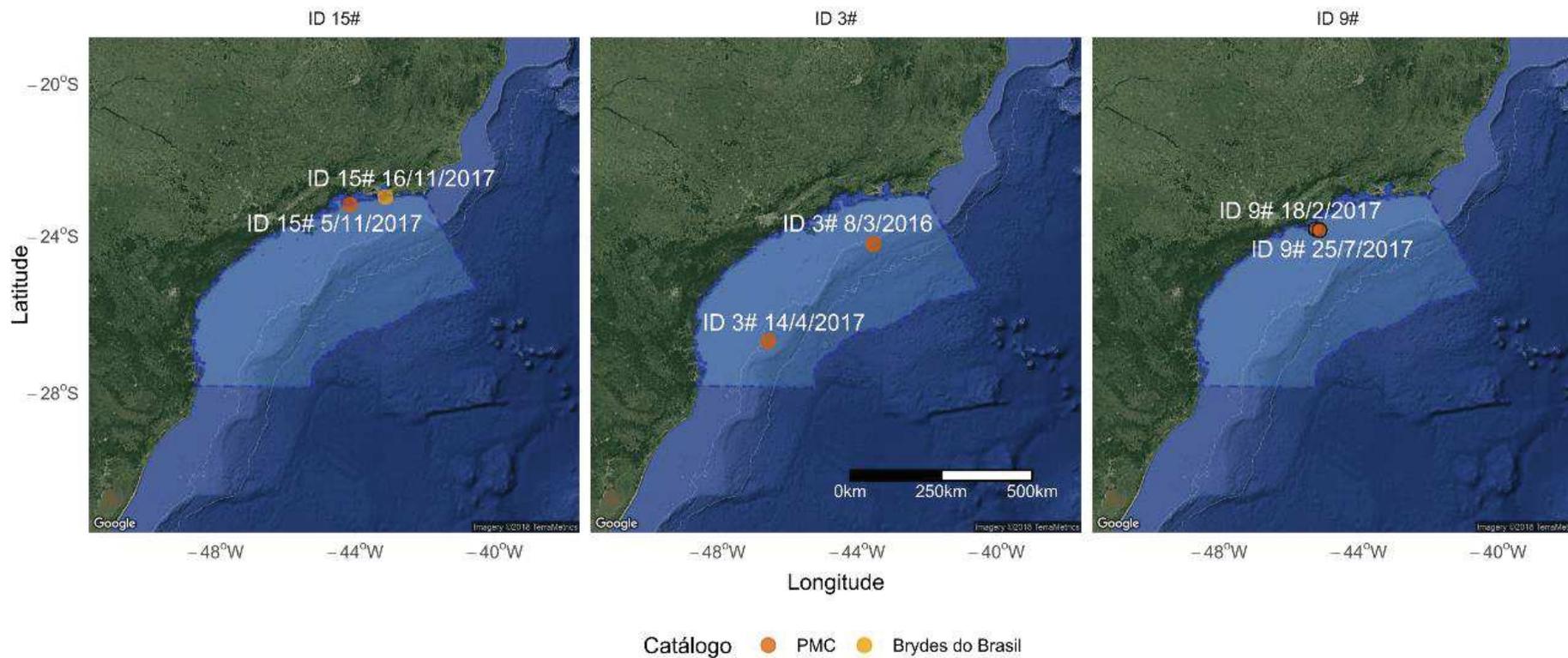


Figura V.2-34: Mapa com as localizações de reavistagens de *Balaenoptera brydei*.

*Reavistagem de *Balaenoptera physalus**

Um indivíduo de *Balaenoptera physalus* foi foto-identificado em dias subsequentes ao longo da 4ª Campanha de Telemetria (**Figura V.2-35**). Entre as avistagens, o indivíduo fez um deslocamento ao norte de aproximadamente 100 km acompanhando a linha do talude (**Figura V.2-35**). Pouco se sabe sobre padrões de movimento da baleia-fin no Atlântico Sul, embora migrações entre áreas reprodutivas e de alimentação sejam uma característica da espécie (MIZROCH et al., 1984). Novos registros são necessários para discussão de qualquer padrão de movimento, no entanto, o deslocamento de 100 km de um dia para o outro sugere um direcionamento para áreas de baixa latitude, possivelmente áreas reprodutivas, visitadas durante inverno/primavera.

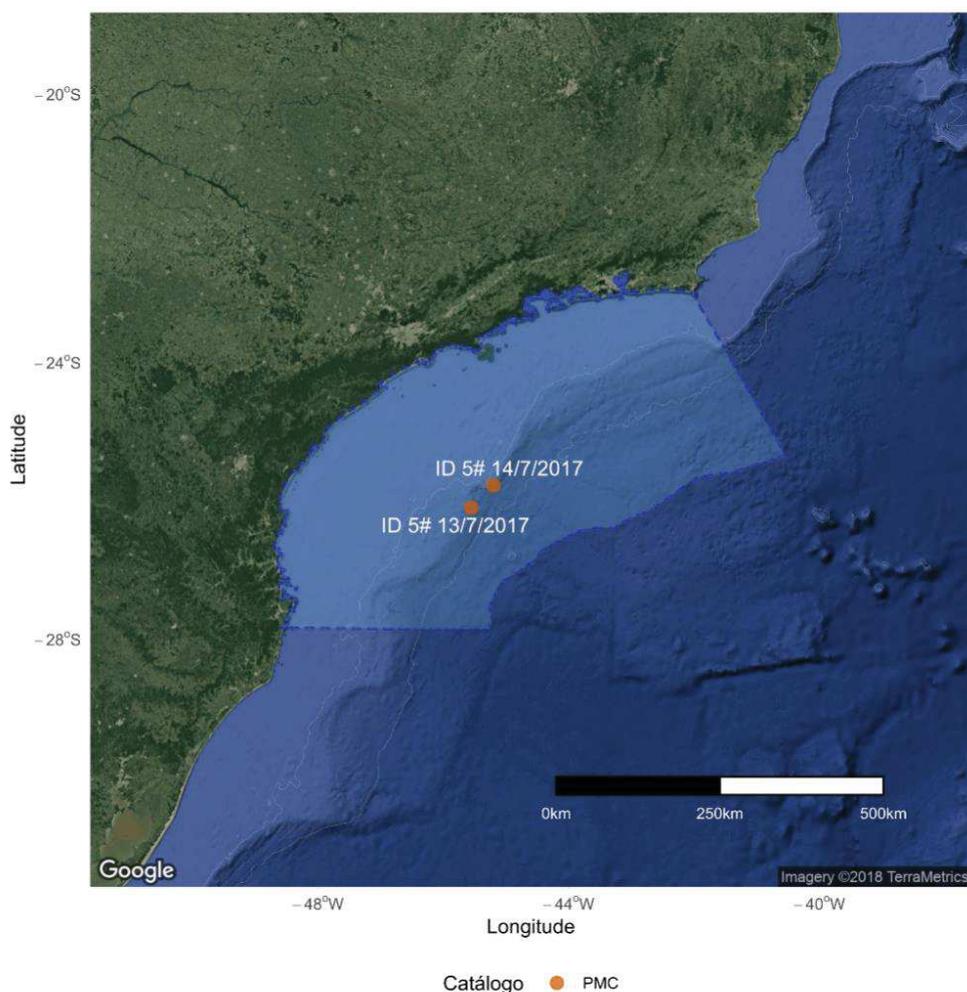


Figura V.2-35: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de *Balaenoptera physalus*.

Reavistagens de *Stenella frontalis*

Ocorreu a primeira reavistagem para *Stenella frontalis* (indivíduo 83#), que é uma das espécies mais frequentes nos registros de foto-identificação. Este é o primeiro relato de movimento individual registrado para a espécie em águas brasileiras, que é observada com frequência ao longo da plataforma continental (MORENO et al., 2005). O primeiro registro ocorreu em 25/07/2017, na 4ª Campanha de Telemetria, enquanto o segundo ocorreu no dia 28/03/2018, na 6ª Campanha de Telemetria (**Figura V.2-36**). Apesar do intervalo de nove meses entre um registro e outro, a distância entre eles foi de apenas 30 km, sugerindo que uma mesma área foi revisitada em momentos subsequentes.

Novos registros são necessários para se discutir padrões de movimento para a espécie.

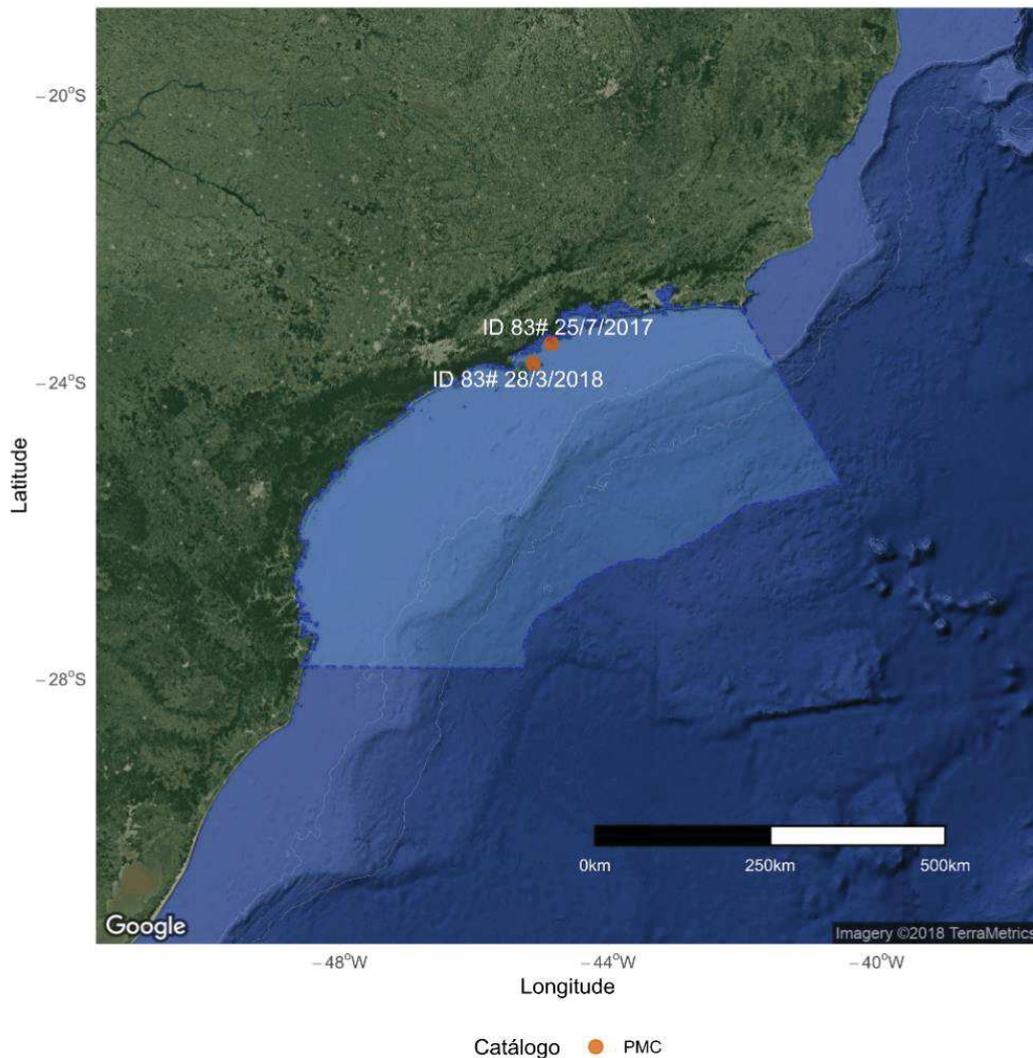


Figura V.2-36: Mapa com as localizações do indivíduo de *Stenella frontalis* reavistado.

Reavistagem de *Peponocephala electra*

Peponocephala electra foi registrada pela primeira vez no 6º Ciclo, tanto na Campanha de Avistagem e MAP, quanto na Campanha de Telemetria. O primeiro registro ocorreu em 07/02/2018, na 6ª Campanha de Avistagem e MAP, enquanto o segundo registro ocorreu em 28/03/2018, na 6ª Campanha

de Telemetria. Possivelmente tratava-se do mesmo grupo, já que 26 indivíduos identificados no primeiro avistamento foram identificados também no segundo. Ambos os registros ocorreram em águas oceânicas, o que é típico da espécie, porém o segundo ocorreu a aproximadamente 500 km ao sul (**Figura V.2-37**). O pouco que se sabe sobre a espécie em águas brasileiras vem de alguns registros de encalhes reportados na literatura (e.g. LODI et al., 1990; BATISTA et al., 2012).

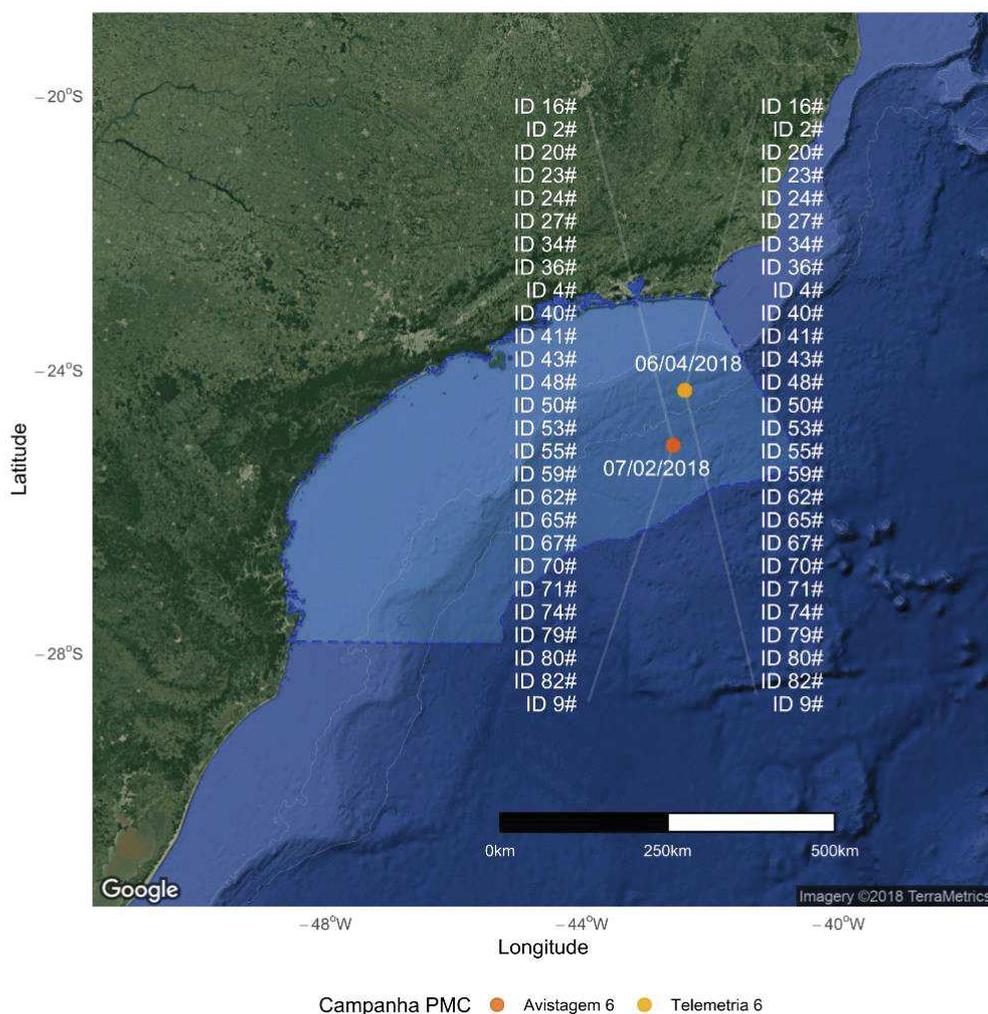


Figura V.2-37: Mapa com as localizações do grupo de *Peponocephala electra* reavistado.

Reavistagens de Balaenoptera borealis

A comparação do catálogo de *Balaenoptera borealis* do PMC-BS com o catálogo das Ilhas Malvinas (Responsável pela comparação: Dra. Caroline Weis, Falklands Conservation) permitiu a identificação de uma reavistagem. O indivíduo 13# do PMC-BS, registrado em 25/08/2016 na 2ª Campanha de Telemetria, foi registrado nas Ilhas Malvinas em 19/02/2017, representando um deslocamento linear de aproximadamente 3.500 km. *Balaenoptera borealis* é tipicamente oceânica (OLSEN et al., 2009) e migra de áreas reprodutivas em águas subtropicais e tropicais para áreas de alimentação em altas latitudes (WEIR et al., 2001). No entanto, pouco se sabe sobre rotas e padrões migratórios da espécie - registros existentes são geralmente procedentes de atividades de caça, e não há registros de movimentos ao longo no Atlântico Sul. O movimento aqui observado é o maior já registrado para um único indivíduo da espécie e sugere o uso de águas de baixa latitude durante o inverno e de alta latitude no verão (**Figura V.2-38**).

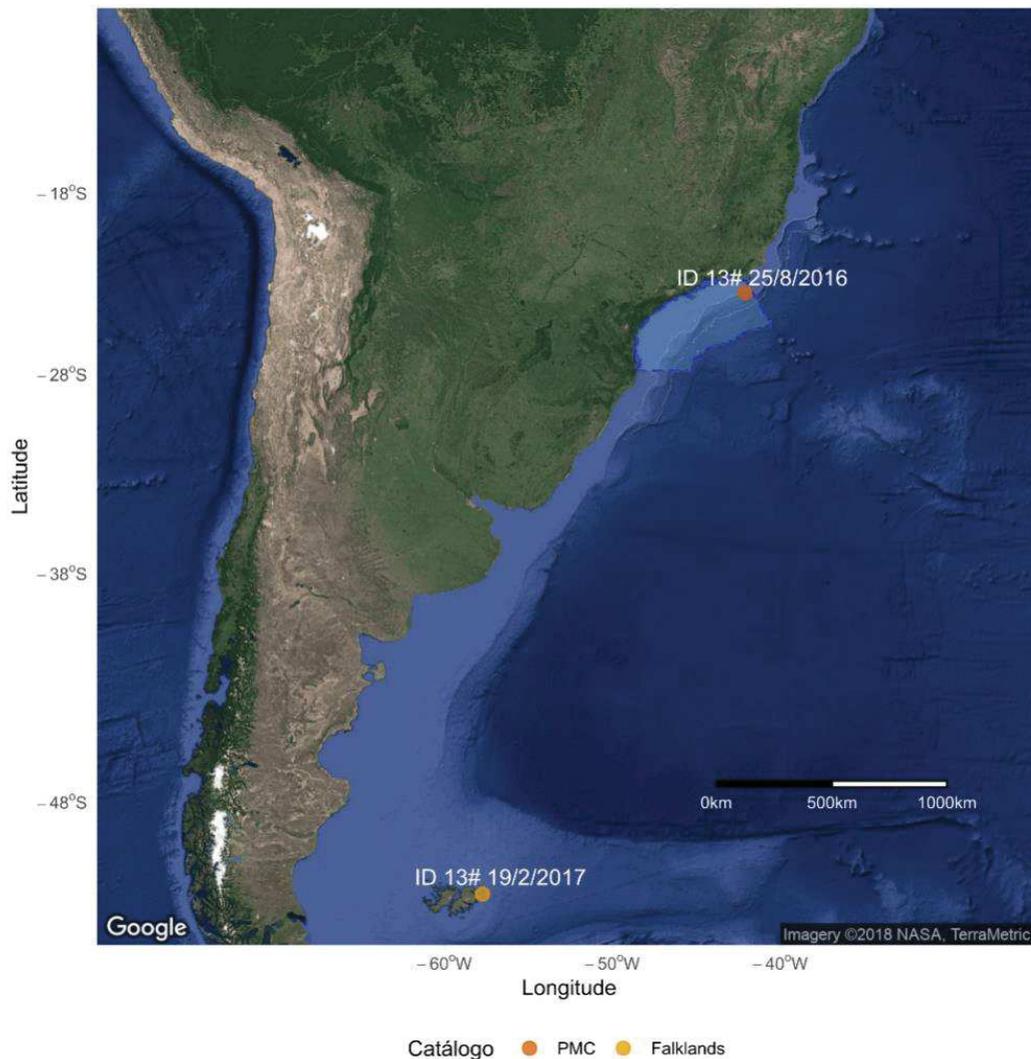


Figura V.2-38: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de *Balaenoptera borealis*.

Reavistagem de *Megaptera novaengliae*

A comparação do catálogo de *Megaptera novaengliae* do PMC-BS com o catálogo do Instituto Baleia Jubarte (IBJ) permitiu a identificação de uma reavistagem. O indivíduo 15# do PMC-BS, registrado em 02/09/2016 na 2ª Campanha de Telemetria, foi encontrado nas proximidades de Ilhabela, representando um deslocamento linear de aproximadamente 500 km (**Figura V.2-39**). *M. novaengliae* realiza um padrão migratório bem definido e conhecido entre áreas reprodutivas e de alimentação, visitando a costa leste do Brasil durante a primavera para reprodução (ZERBINI et al., 2006). Nesse

registro, porém, o movimento parece ser em sentido contrário ao esperado. Após o registro em Ilhabela (registro realizado oportunamente e cedido ao IBJ), a expectativa seria um movimento em direção a áreas reprodutivas ao norte, no entanto, o indivíduo se deslocou ao sul, sendo registrado pelo PMC-BS 45 dias depois nas proximidades da Baía da Babitonga. Nesse período, um grupo desta espécie foi monitorado por alguns dias pelo PMC-BS em aparente atividade de forrageio nessa área. Tal registro, somado a dados complementares de Telemetria do PMC-BS, sugere um recente uso de áreas costeiras durante o período migratório ou por indivíduos que não chegam a completar a migração para áreas reprodutivas, permanecendo em áreas costeiras ao longo do caminho em atividades de forrageio.

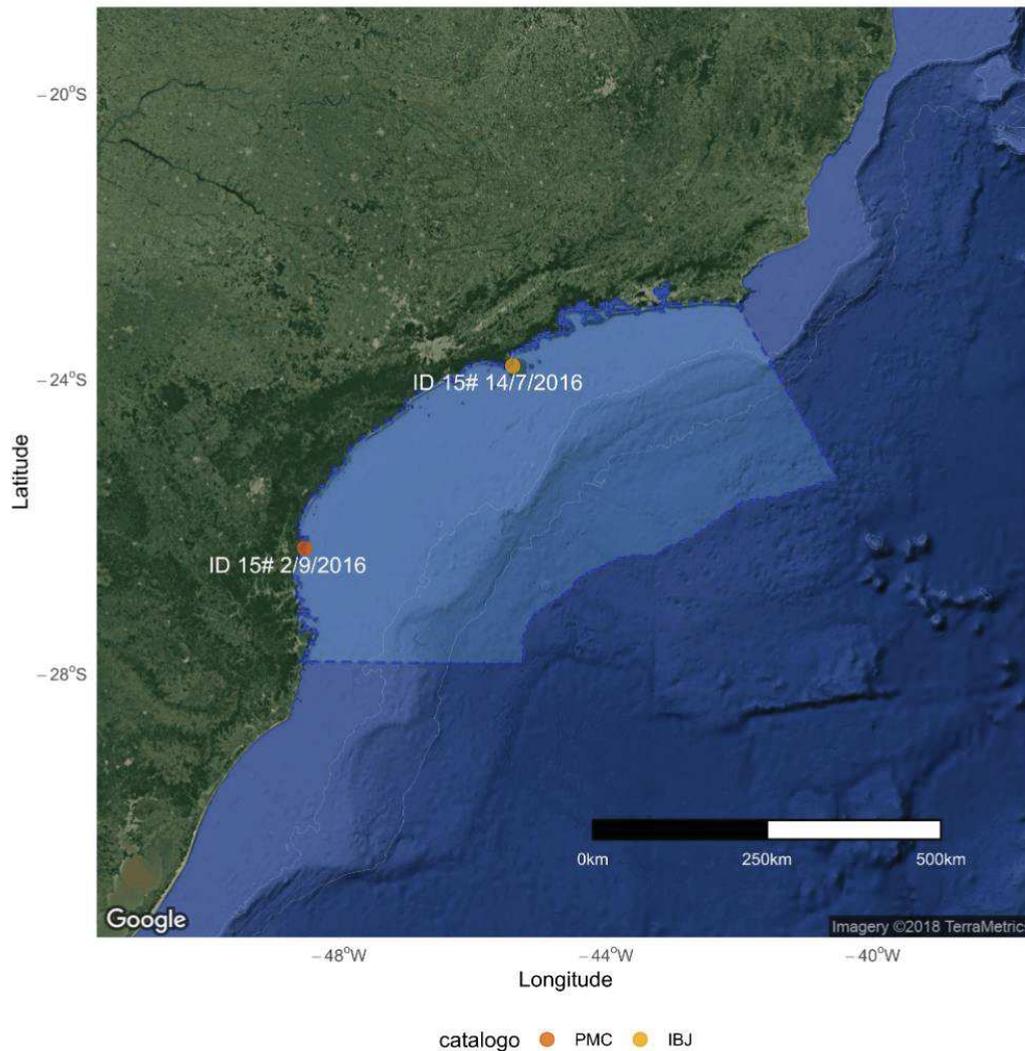


Figura V.2-39: Mapa com as localizações do indivíduo reavistado de *Megaptera novaeangliae*.

V.2.2 Estrutura de populações por genética para algumas espécies

Apesar da alta capacidade de dispersão, várias espécies de cetáceos possuem maior estrutura populacional do que seria esperado em escalas geográficas relativamente pequenas devido à história demográfica ou à associação de habitat ao comportamento de forrageio. Uma técnica que tem sido amplamente utilizada para análise de estrutura populacional em cetáceos é a genética molecular, sendo de grande importância para identificar unidades de conservação e estimar fluxo gênico entre as populações (HOELZEL et al.,

2002).

Até o momento, a estrutura genética populacional está sendo investigada preliminarmente para as espécies com um número amostral mínimo de 20 indivíduos que tiveram amostragem tanto em áreas costeiras quanto em áreas oceânicas. O golfinho-nariz-de-garrafa foi a terceira espécie com maior amostragem ($n = 43$) nas campanhas, e uma das únicas amostradas que possui dados genéticos publicados no Brasil para comparação (COSTA et al., 2016; FRUET et al., 2017). Embora a espécie apresente diferenciação entre ecótipos costeiros e oceânicos, tanto no leste do Oceano Pacífico Norte quanto no Oceano Atlântico Norte, a estrutura populacional em fina escala dentro de áreas costeiras e estuarinas também tem sido detectada (LOWTHER-THIELEKING et al., 2014; LOUIS et al., 2014; FRUET et al., 2014). Recentemente, estudos de morfologia craniana e de genética têm apresentado diferenciação entre os ecótipos costeiro e oceânico de *T. truncatus* no sudoeste do Oceano Atlântico (COSTA et al., 2016; FRUET et al., 2017). Enquanto o ecótipo costeiro possui uma distribuição restrita às águas rasas (< 20 metros) do litoral sul do Brasil (acima de 27°S), e estão associados à foz dos rios, estuários e lagoas (SIMÕES-LOPES & FÁBIAN, 1999; LAPORTA et al., 2016), as avistagens do ecótipo oceânico são relatadas principalmente em águas profundas (> 150 metros) na quebra da plataforma continental (> 100 km) (DI TULLIO et al., 2016).

A maioria das amostras da espécie nas campanhas do PMC-BS foi coletada próximo à costa ($n = 36$ de um total de 43 amostras coletadas da espécie), em profundidades menores que 60 metros (**Figura V.2-40**). No entanto, os indivíduos apresentaram uma morfologia característica do ecótipo oceânico, com a coloração mais escura, a nadadeira dorsal falcada e o rostro mais curto (conforme descrição em COSTA et al., 2016).

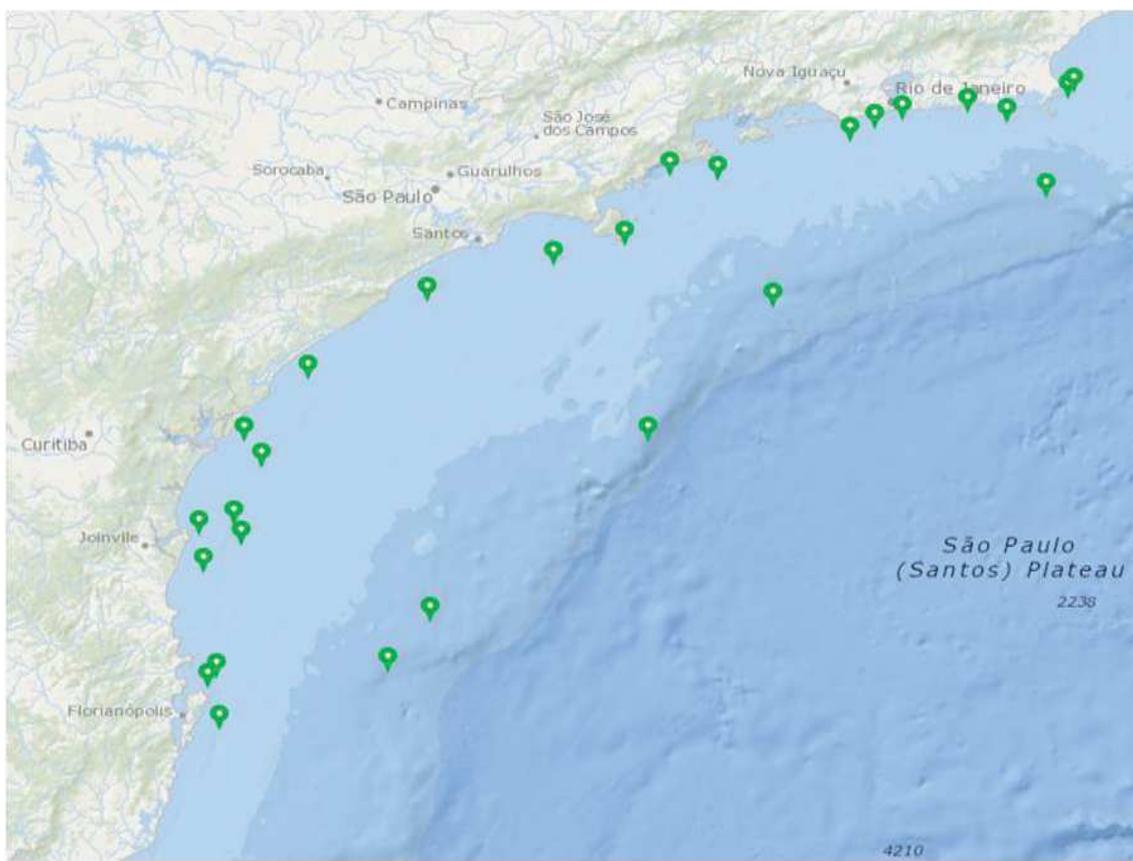


Figura V.2-40: Locais de coleta de biópsia dos indivíduos de *Tursiops truncatus* na Bacia de Santos durante o PMC-BS.

Para investigar a estrutura genética dos golfinhos-nariz-de-garrafa amostrados na Bacia de Santos e identificar o ecótipo ao qual eles pertencem, os 14 haplótipos de DNAm_t encontrados até o momento foram comparados com os haplótipos (números de acesso no GenBank: MF405801 - MF405833) reportados em um estudo genético que engloba amostras dos dois ecótipos (FRUET et al., 2017). Além disso, foram incluídos na comparação os dois haplótipos (números de acesso no GenBank: KC896604 e KC896608) encontrados na população oceânica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (CASTILHO et al., 2015).

Para incluir as sequências dos 35 haplótipos publicados (33 haplótipos do sul do Brasil e 2 haplótipos do ASPSP), o alinhamento (675 pares de bases) das 42 sequências da Bacia de Santos foi encurtado para 457 pares de bases. Esse alinhamento de 77 sequências resultou em 44 haplótipos definidos por 49

sítios polimórficos.

Desses haplótipos, quatro foram compartilhados entre as amostras da Bacia de Santos e os haplótipos HAP009, HAP012, HAP013 e HAP016 (MF405815, MF405812, MF405816 e MF405818, respectivamente) encontrados em amostras do ecótipo oceânico, nove foram exclusivos das amostras da Bacia de Santos, dois foram exclusivos do ASPSP e 29 foram exclusivos do estudo de FRUET et al. (2017) (**Tabela V.2-7**). Três (HAP009, HAP012 e HAP016) dos quatro haplótipos compartilhados foram encontrados somente no haplogrupo 3, que engloba somente as amostras oceânicas, sendo que dois desses haplótipos (HAP009 e HAP012) foram os que apresentaram maior frequência de indivíduos (HAP9 = 8 indivíduos e HAP10 = 12 indivíduos, ver **Tabela V.2-7**) da espécie na Bacia de Santos. A maioria foi amostrada na área costeira, exceto o indivíduo G99.

Tabela V.2-7: *Frequência dos haplótipos (457 pares de base) da região controle do DNAm de Tursiops truncatus na Bacia de Santos (BS) e haplótipos compartilhados e privados entre os T. truncatus dos ecótipos costeiro e oceânico do sul do Brasil (FRUET et al., 2017) e oceânico do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (CASTILHO et al., 2015).*

Haplótipos	Nº acesso GenBank, haplótipo ou amostra	Amostras Bacia Santos	Ecótipo costeiro	Ecótipo oceânico
HAP1	KC896608_H1	0	0	13 do ASPSP
HAP2	KC896604_H2	0	0	4 do ASPSP
HAP3	HAP003	0	1	0
HAP4	HAP004	0	12	0
HAP5	HAP005	0	2	0
HAP6	HAP006	0	2	0
HAP7	HAP007	0	22	0
HAP8	HAP008	0	61	0
HAP9	HAP009, G5, G8, G15, G17, G33, G99, G125, G238	8	0	7
HAP10	HAP012, G12, G13, G31, G34, G47, G48, G108, G109, G113, G114, G127,	12	0	3

Haplótipos	Nº acesso GenBank, haplótipo ou amostra	Amostras Bacia Santos	Ecótipo costeiro	Ecótipo oceânico
	G237			
HAP11	HAP013, G18	1	0	1
HAP12	HAP014	0	8	0
HAP13	HAP016, G123, G126, G143, G236, G239	5	0	4
HAP14	HAP019	0	0	5
HAP15	HAP020	0	7	0
HAP16	HAP021	0	12	0
HAP17	HAP023	0	0	6
HAP18	HAP024	0	1	0
HAP19	HAP025	0	1	0
HAP20	HAP026	0	0	6
HAP21	HAP027	0	0	1
HAP22	HAP028	0	0	1
HAP23	HAP030	0	0	1
HAP24	HAP031	0	0	1
HAP25	HAP032	0	0	1
HAP26	HAP033	0	0	1
HAP27	HAP034	0	0	1
HAP28	HAP035	0	0	1
HAP29	HAP036	0	0	1
HAP30	HAP037	0	0	1
HAP31	HAP038	0	0	1
HAP32	HAP039	0	0	1
HAP33	HAP040	0	0	1
HAP34	HAP041	0	0	1
HAP35	TLD012	0	-	-
HAP36	G1, G6	2	0	0
HAP37	G2, G14, G84, G122, G168	5	0	0
HAP38	G7, G208	2	0	0
HAP39	G32, G228	2	0	0
HAP40	G37	1	0	0
HAP41	G58	1	0	0
HAP42	G100	1	0	0
HAP43	G128	1	0	0
HAP44	G173	1	0	0

Adicionalmente, os haplótipos de *T. truncatus* que ocorrem na Bacia de Santos, e dos ecótipos costeiros e oceânicos, foram comparados com os haplótipos (números de acesso no GenBank: KP404604 - KP404611) encontrados em um estudo genético de *T. truncatus* no sul do Brasil. Esse estudo incluiu amostras de Laguna, Santa Catarina, da foz do Rio Mampituba, Rio Grande do Sul, e amostras de encalhe do litoral dos dois estados (COSTA et al., 2015).

Para incluir as sequências mais curtas dos oito haplótipos publicados, o alinhamento das 77 sequências anterior foi encurtado para 316 pares de bases. O alinhamento das 85 sequências resultou em 43 haplótipos definidos por 39 sítios polimórficos. Desses haplótipos, dois foram compartilhados entre as amostras da Bacia de Santos, os haplótipos KP404607 e KP404608 do sul do Brasil, e respectivamente HAP012 e HAP009 do ecótipo oceânico. Um haplótipo foi compartilhado entre uma amostra da Bacia de Santos e o haplótipo KP404604, do sul do Brasil; três foram compartilhados entre os haplótipos KP404606, KP404610 e KP404611, do sul do Brasil, e os haplótipos HAP007, HAP008 e HAP014 encontrados em amostras do ecótipo costeiro; e quatro foram compartilhados entre as amostras da Bacia de Santos e os haplótipos HAP013, HAP016, HAP019 e HAP023 encontrados em amostras do ecótipo oceânico. Dois foram exclusivos do ASPSP, 23 foram exclusivos do estudo de FRUET et al. (2017), seis foram exclusivos das amostras da Bacia de Santos, e os outros dois foram exclusivos do estudo de COSTA et al. (2015) (**Tabela V.2-8**).

Interessantemente, os três haplótipos de *T. truncatus* do sul do Brasil compartilhados com as amostras da Bacia de Santos foram encontrados somente no grupo 3 (Cluster 3) de COSTA et al. (2015), que eram amostras de encalhes no litoral de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, e que foram diferenciadas das amostras das duas populações estuarinas residentes, uma de Laguna, Santa Catarina, e outra de Tramandaí, Rio Grande do Sul. Além disso, dois desses haplótipos foram também compartilhados com os haplótipos HAP009 e HAP012 do ecótipo oceânico. Ao contrário, os três haplótipos

encontrados nos grupos 1 e 2 (de Laguna e Tramandaí, respectivamente) foram compartilhados com haplótipos do ecótipo costeiro. Apesar desse resultado ainda ser preliminar e da necessidade de obter mais amostras para elucidar a estrutura populacional da espécie, esse compartilhamento de haplótipos indica que os indivíduos de *T. truncatus* amostrados na área costeira da Bacia de Santos pertencem ao ecótipo oceânico, sendo possivelmente uma população costeira não residente, ou oceânica, que frequenta a costa, com altos níveis de diversidade genética.

Tabela V.2-8: *Frequência dos haplótipos (316 pares de base) da região controle do DNAmT de Tursiops truncatus na Bacia de Santos (BS) e haplótipos compartilhados e privados entre os T. truncatus do sul do Brasil (COSTA et al., 2017), ecótipos costeiro e oceânico (FRUET et al., 2017), e oceânico do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (CASTILHO et al., 2015).*

Haplótipos	Nº acesso GenBank, haplótipo ou amostra	Amostras Bacia Santos	Ecótipo costeiro	Ecótipo oceânico
HAP1	KC896608_H1	0	0	13 do ASPSP
HAP2	KC896604_H2	0	0	4 do ASPSP
HAP3	HAP003	0	1	0
HAP4	HAP004	0	12	0
HAP5	HAP005	0	2	0
HAP6	HAP006	0	2	0
HAP7	HAP007, KP404606 (grupos 1, 2 e 3)	0	22	0
HAP8	HAP008, KP404610 (grupos 2 e 3)	0	61	0
HAP9	HAP009, KP404608 (grupo 3), G5, G8, G15, G17, G33, G99, G125, G238	8	0	7
HAP10	HAP012, KP404607 (grupo 3) G12, G13, G31, G34, G47, G48, G108, G109, G113, G114, G127, G237	12	0	3
HAP11	HAP013, HAP039, G18	1	0	2

Haplótipos	Nº acesso GenBank, haplótipo ou amostra	Amostras Bacia Santos	Ecótipo costeiro	Ecótipo oceânico
HAP12	HAP014, KP404611 (grupo 2)	0	8	0
HAP13	HAP016, G123, G126, G143, G236, G239	5	0	4
HAP14	HAP019, G1, G6	2	0	5
HAP15	HAP020	0	7	0
HAP16	HAP021	0	12	0
HAP17	HAP023, G2, G14, G84, G122, G168	5	0	6
HAP18	HAP024	0	1	0
HAP19	HAP025	0	1	0
HAP20	HAP026	0	0	6
HAP21	HAP027	0	0	1
HAP22	HAP028	0	0	1
HAP23	HAP030	0	0	1
HAP24	HAP031	0	0	1
HAP25	HAP032	0	0	1
HAP26	HAP033	0	0	1
HAP27	HAP034	0	0	1
HAP28	HAP035	0	0	1
HAP29	HAP036	0	0	1
HAP30	HAP037	0	0	1
HAP31	HAP038	0	0	1
HAP32	HAP040	0	0	1
HAP33	HAP041	0	0	1
HAP34	TLD012	0	-	-
HAP35	KP404604 (grupo 3), G37	1	-	-
HAP36	KP404605 (grupo 3)	0	0	0
HAP37	KP404609	0	0	0
HAP38	G7, G208	2	0	0
HAP39	G32, G228	2	0	0
HAP40	G58	1	0	0
HAP41	G100	1	0	0
HAP42	G128	1	0	0
HAP43	G173	1	0	0

Embora os haplótipos encontrados nas amostras da Bacia de Santos não tenham sido compartilhados com os dois do ASPSP, um haplótipo encontrado em três indivíduos (G2, G84 e G168) amostrados em áreas oceânicas (em 242, 341 e 225 metros de profundidade, respectivamente) e em dois indivíduos (G14 e G122) amostrados próximo da costa (em 56 e 49 metros de profundidade) foi compartilhado com indivíduos de *T. truncatus* do Arquipélago dos Açores e do Golfo da Biscaia (QUEROUIL et al., 2007; LOUIS et al., 2104). Esse resultado corrobora a falta de estrutura encontrada nos indivíduos oceânicos de *T. truncatus* do Atlântico Norte, sugerindo que a população desse oceano é uma grande população panmítica.

A existência de estruturação genética e o provável número de populações (k) de *T. truncatus* na Bacia de Santos foi também avaliada usando os locos de microssatélites e uma abordagem de agrupamento Bayesiano implementada no programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2007). Primeiro, foram realizadas cinco corridas independentes para cada número de agrupamento (k) entre 1 e 4, com nenhuma informação sobre local de amostragem, usando os modelos de "admixture" e "correlated allele frequencies", com um burn-in de 500.000 e uma amostragem de 1.000.000 interações. Uma segunda série de análises foi realizada usando os mesmos parâmetros, mas com a informação sobre o local de amostragem, separando indivíduos amostrados em áreas costeiras (n = 36) daqueles amostrados em áreas oceânicas (n = 7), para auxiliar na identificação de agrupamentos.

Os resultados gerados foram processados no STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 (EARL & VONHOLDT, 2012), que determina o melhor número de agrupamentos usando o método de Evanno (EVANNO et al., 2005). Os múltiplos resultados gerados pelo STRUCTURE foram resumidos no CLUMPP (JAKOBSSON & ROSENBERG, 2007) e exibidos graficamente pelo DISTRUCT (ROSENBERG, 2004).

Os resultados do STRUCTURE, com e sem informação sobre local de amostragem, apresentaram a maior probabilidade posterior (Mean LnP(K) = -1356) de k = 1, indicando uma única população de *T. truncatus* na Bacia de Santos. Embora esses resultados não tenham sido corroborados pelo método

ΔK de EVANNO et al. (2005), que favoreceu $K = 3$ (Figura V.2-41) na análise sem informação sobre local de amostragem, e $K = 2$ (Figura V.2-41) na análise com local de amostragem informado, em um exame minucioso, todos os indivíduos foram misturados e os valores de atribuição foram próximos de 0,5 (Figura V.2-42), indicando que o programa está atribuindo os indivíduos aleatoriamente às populações K devido à falta de estrutura subjacente.

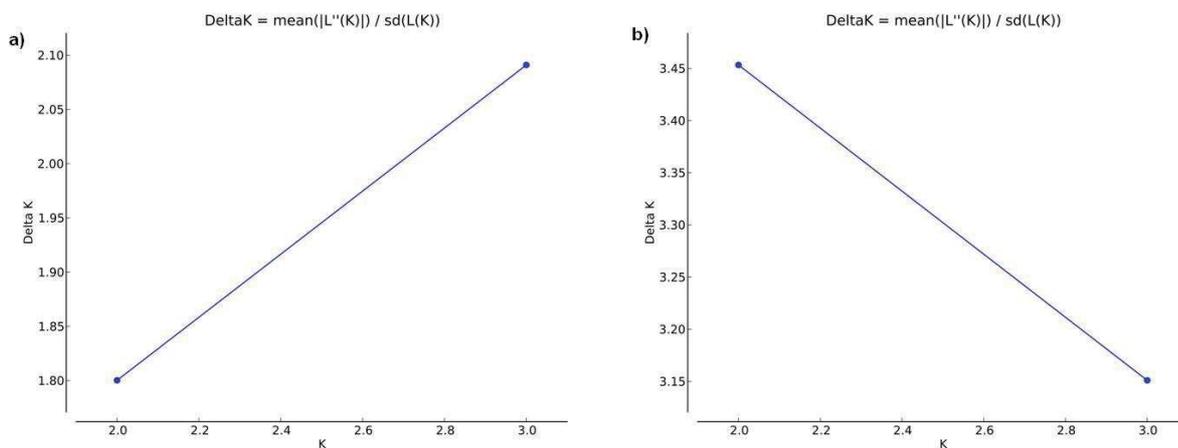


Figura V.2-41: ΔK calculado usando STRUCTURE HARVESTER para agrupamentos de 1 a 4 dos *Tursiops truncatus* da Bacia de Santos; a) sem informação sobre o local de amostragem, b) com informação sobre o local de amostragem.

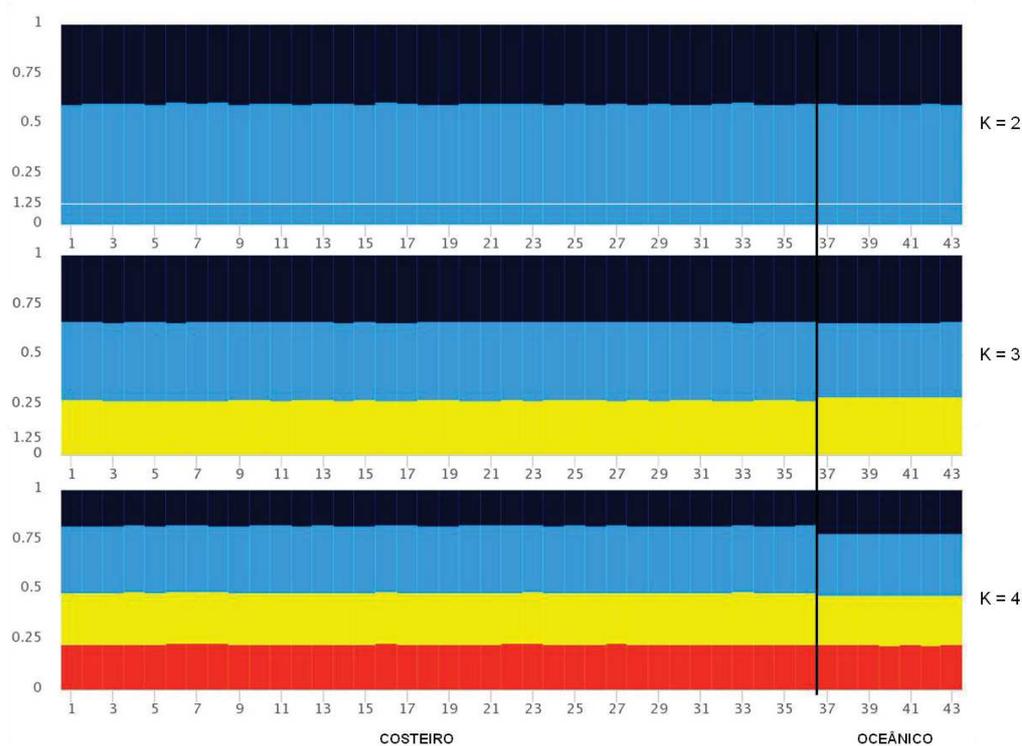


Figura V.2-42: Gráfico do STRUCTURE com a proporção de associação de cada indivíduo de *Tursiops truncatus* a cada agrupamento para $K = 2$ a $K = 4$ com o local de amostragem na Bacia de Santos informado (costeiro x oceânico). Cada indivíduo é representado por uma barra vertical dividida em segmentos coloridos com o comprimento indicando o coeficiente de associação a cada agrupamento.

Esse resultado em conjunto com o compartilhamento de haplótipos dos indivíduos amostrados na costa da Bacia de Santos com aqueles do ecótipo oceânico e a recaptura de um indivíduo, com morfologia do ecótipo oceânico, fotografado pela primeira vez próximo à costa e um ano depois reavistado a aproximadamente 700 km ao norte do primeiro registro, sugere que a população de *T. truncatus* na Bacia de Santos faz parte de uma população panmítica, com os indivíduos oceânicos utilizando as áreas costeiras com frequência.

Interessantemente, no leste do Oceano Pacífico, as amostras coletadas a mais de 1 km de distância da costa foram consideradas como pertencentes à população oceânica (LOWTHER-THIELEKING et al., 2015). Finalmente, esses

resultados corroboram os estudos genéticos dos golfinhos-nariz-de-garrafa de diferentes regiões, que têm evidenciado que os golfinhos oceânicos exibem maior diversidade e menor diferenciação genética que aqueles restritos às águas rasas das populações costeiras (QUÉROUIL et al., 2007; TENZANOS-PINTO et al., 2009; FRUET et al., 2017). Este padrão sugere maiores populações para o ecótipo oceânico em contraste com populações menores e mais especializadas do ecótipo costeiro.

A espécie com maior amostragem nas campanhas do PMC-BS foi *S. frontalis* (n = 66), sendo que 33 indivíduos foram amostrados próximo à costa (profundidade abaixo de 80 metros) e 33 indivíduos em áreas oceânicas (**Figura V.2-43**). Dos 12 haplótipos encontrados nesses indivíduos, dois foram exclusivos de dois indivíduos costeiros, dois foram exclusivos de dois indivíduos oceânicos e oito foram compartilhados entre ambos, sendo que três (HAP2, HAP3 e HAP5) apresentaram uma frequência maior de indivíduos oceânicos e três (HAP7, HAP8, HAP9) uma frequência maior de indivíduos costeiros (**Tabela V.2-9**).

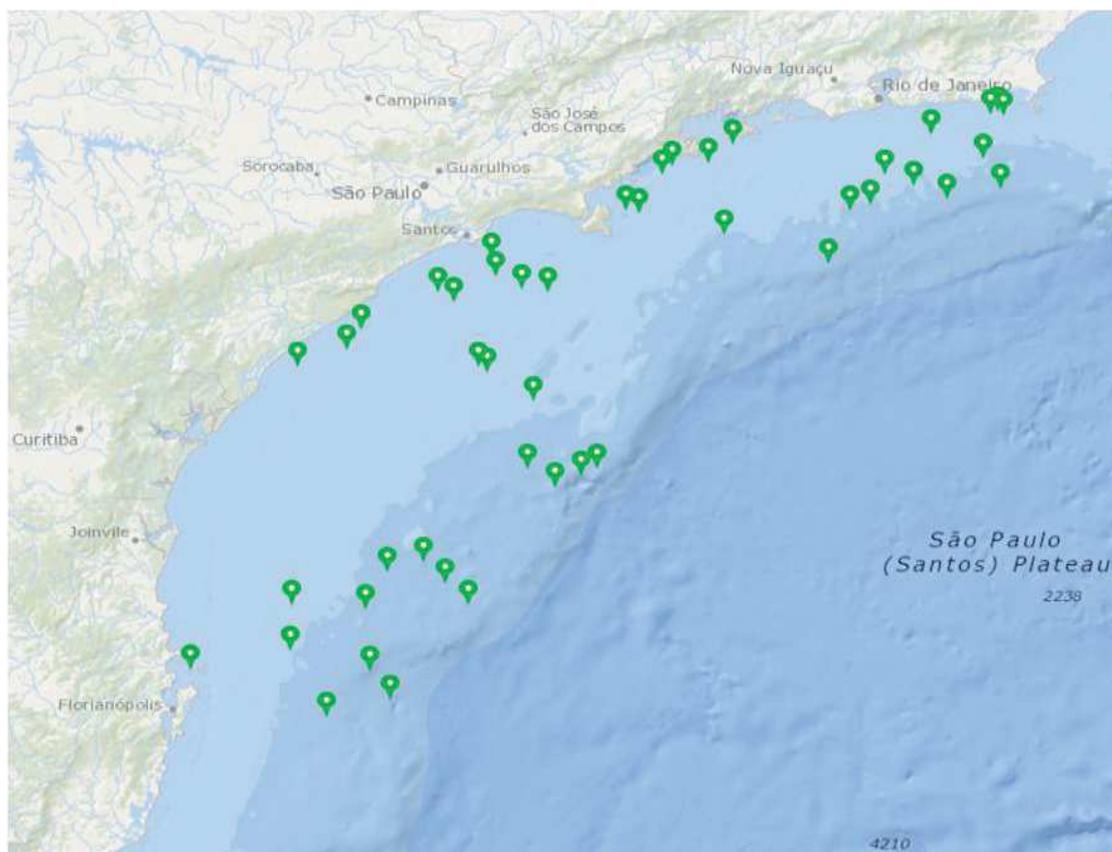


Figura V.2-43: Locais de coleta de biópsias dos indivíduos de *Stenella frontalis* na Bacia de Santos durante o PMC.

Os haplótipos encontrados na Bacia de Santos também foram comparados com os três haplótipos (números de acesso no GenBank: KC204733 - KC204735) encontrados em indivíduos de *S. frontalis* do Brasil (CABALLERO et al., 2013). Para incluir as sequências mais curtas desses haplótipos, o alinhamento foi encurtado para 365 pares de bases, resultando em 7 haplótipos definidos por 9 sítios polimórficos. Os três haplótipos foram compartilhados com as amostras da Bacia de Santos, sendo que o haplótipo KC204733 foi compartilhado com o haplótipo de seis indivíduos costeiros (G79, G83, G155, G174, G178 e G214) e três oceânicos (G171, G206 e G210), o haplótipo KC204734 foi compartilhado com um indivíduo costeiro (G166), e o haplótipo KC204735 com cinco indivíduos oceânicos (G36, G40, G92, G211 e G219) e três costeiros (G120, G124 e G179). Além disso, dois haplótipos (HAP2 e HAP4) da Bacia de Santos foram compartilhados com haplótipos descritos para

o oeste do Oceano Atlântico Norte (SF42) e para o Arquipélago dos Açores (SFM11), respectivamente (QUEROIUL et al., 2010; VIRICEL & ROSEL 2014).

Tabela V.2-9: *Frequência dos haplótipos da região controle do DNAmT de Stenella frontalis na Bacia de Santos (BS). N número de indivíduos amostrados em área costeira ou oceânica.*

Haplótipos	Número amostra	N costeiro	N oceânico
HAP1	G9, G35	1	1
HAP2	G26, G27, G38, G39, G46, G61, G87, G115, G167, G200, G227, G232, G241	3	10
HAP3	G36, G40, G92, G120, G121, G179, G211, G219	3	5
HAP4	G43	0	1
HAP5	G49, G91, G218, G226, G243	1	4
HAP6	G50	0	1
HAP7	G53, G54, G55, G56, G57, G111, G117, G118, G119, G158, G159, G172, G213, G220, G233, G234, G235, G242	13	5
HAP8	G79, G83, G155, G171, G174, G178, G206, G210, G214	6	3
HAP9	G82, G90, G207, G231	3	1
HAP10	G124	1	0
HAP11	G154, G221, G222	1	2
HAP12	G166	1	0

Como houve um número significativo de amostras coletadas tanto em áreas costeiras quanto oceânicas, a diferenciação genética populacional entre as sequências da região controle do DNAmT foi estimada pelo índice de fixação F_{ST} usando o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHÉ, 2010). Não houve diferenciação significativa entre os indivíduos costeiros e oceânicos ($F_{ST} = 0,019$, $P = 0,153$).

Adicionalmente, a existência de estruturação genética e o provável número de populações (k) de *S. frontalis* na Bacia de Santos foram avaliados com base na análise bayesiana do programa STRUCTURE 2.3.3, usando os locos de microsatélites. Foram realizadas cinco corridas independentes para cada número de agrupamento (k) entre 1 e 4, com nenhuma informação sobre local

de amostragem, usando os modelos de "admixture" e "correlated allele frequencies". O comprimento das corridas foi o mesmo descrito acima para *T. truncatus*. Além disso, uma segunda análise bayesiana foi realizada usando os mesmos parâmetros, mas com informação prévia sobre local de amostragem, separando indivíduos amostrados em áreas costeiras (n = 33) daqueles amostrados em áreas oceânicas (n = 33). Os resultados gerados foram processados no STRUCTURE HARVESTER, e os múltiplos resultados gerados pelo STRUCTURE foram resumidos no CLUMPP e exibidos graficamente pelo DISTRUCT.

Ambas as análises (com e sem informação sobre local de amostragem) apresentaram a maior probabilidade posterior (Mean LnP(K) = -2553 e -2557, respectivamente) para uma única população (k = 1) de *S. frontalis* na Bacia de Santos. No entanto, esses resultados não foram corroborados pelo método ΔK de EVANNO et al. (2005), que favoreceu K = 2 (**Figura V.2-44**) nas duas análises. Apesar disso, todos os indivíduos foram misturados e os valores de atribuição foram similares em cada k (**Figura V.2-44**), indicando que o programa está atribuindo os indivíduos aleatoriamente às populações K pela falta de estrutura subjacente.

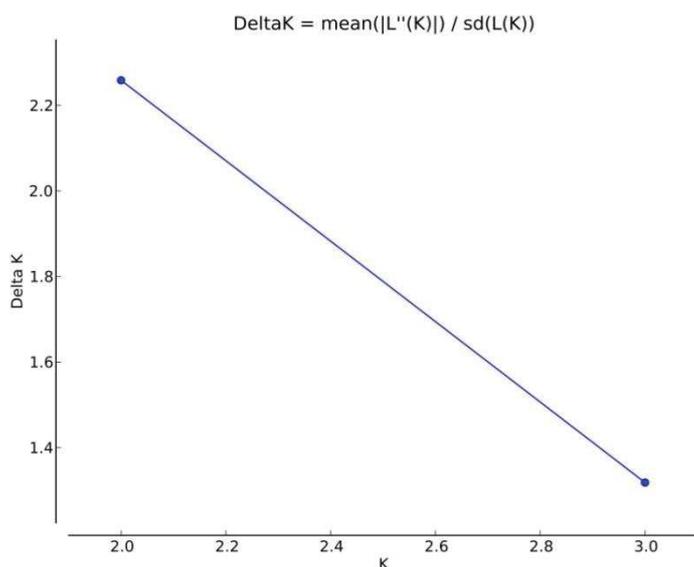


Figura V.2-44: ΔK calculado usando STRUCTURE HARVESTER para agrupamentos de 1 a 4 dos *Stenella frontalis* da Bacia de Santos.

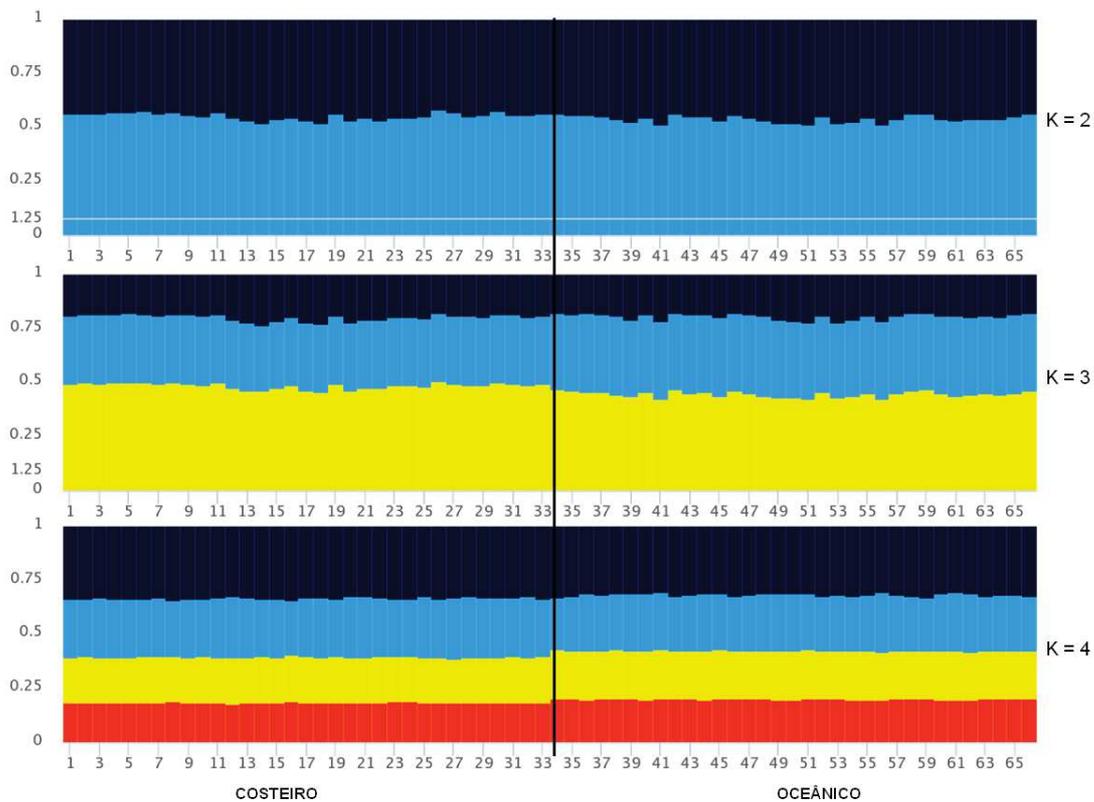


Figura V.2-45: Gráfico do STRUCTURE com a proporção de associação de cada indivíduo de *Stenella frontalis* a cada agrupamento para $K = 2$ a $K = 4$ com o local de amostragem na Bacia de Santos informado (costeiro x oceânico). Cada indivíduo é representado por uma barra vertical dividida em segmentos coloridos com o comprimento indicando o coeficiente de associação a cada agrupamento.

Os resultados não apresentaram estrutura populacional para *S. frontalis* na área de estudo, indicando a existência de fluxo gênico entre os indivíduos costeiros e oceânicos, e sugerindo que *S. frontalis* da Bacia de Santos devem fazer parte de uma única população panmítica. Interessantemente, esses dados diferem do padrão de estrutura populacional observado no oeste do Oceano Atlântico Norte, onde populações costeiras e oceânicas são distinguidas (VIRICEL & ROSEL, 2014). No entanto, esses resultados são preliminares. Mais amostras e provavelmente mais locos de microsatélites são necessários para investigar a estrutura genética populacional da espécie na Bacia de Santos.

V.3 *Biologia populacional*

V.3.1 *Estimativas de densidade de cetáceos em Campanhas de Avistagem Embarcada*

A densidade e abundância são dois parâmetros demográficos básicos para a descrição de populações de seres vivos. Uma abordagem de monitoramento populacional permitirá mensurar repetidamente a densidade e a abundância de populações de interesse. As tendências ao longo do tempo na abundância de uma espécie ou grupo de animais refletem a saúde da população e sua resiliência a potenciais danos causados pelo homem ao seu ambiente ou diretamente aos indivíduos.

Uma abordagem adequada para estimar parâmetros populacionais como densidade é o método de transecções lineares com amostragem de distâncias (BUCKLAND et al., 2001). Uma vantagem é que este método lida com um problema comum em amostragens de populações animais, que é a detecção imperfeita. Um dos potenciais problemas em contagens ao longo de linhas de transecção é o fato de que a detectabilidade diminui com a distância do observador. Este método procura corrigir esse viés considerando o processo de detecção de grupos e a influência da distância e outras variáveis por meio de uma função/curva de detecção ajustada aos dados.

Este item apresenta as estimativas de densidade e abundância ao longo das campanhas de avistagem embarcada em três anos de esforço na Bacia de Santos. Foram geradas estimativas para quatro grupos de cetáceos em seis campanhas realizadas em diferentes estações do ano: (a) Mistictetos; (b) Odontocetos; (c) baleia-jubarte; e (d) golfinho-pintado-do-Atlântico.

Análise dos dados

A distância de cada grupo de cetáceo foi calculada usando o ângulo da avistagem e a altura da torre de observação. O ângulo foi obtido pela leitura do número de retículos de binóculos 7x50 e utilizando as conversões de retículos

disponíveis na literatura que consideram a curvatura da Terra (LERCZAK & HOBBS, 1998; KINZEY & GERRODETTE, 2001). Finalmente, a distância perpendicular da detecção em relação à linha de transecção, que foi usada para modelar a curva de detecção, foi estimada usando a distância do grupo, calculada pelo retículo e pelo ângulo entre a avistagem e a rota do navio, medida por uma alidade.

Os modelos de detecção foram construídos com os dados de distância perpendicular das detecções usando o programa 'Distance' (THOMAS et al., 2010). Antes da modelagem, as observações mais distantes foram eliminadas. Testaram-se modelos que consideram diferentes fatores que podem afetar a distância com que os cetáceos são observados, que foram inseridos nos modelos de detecção como covariáveis (MARQUES & BUCKLAND, 2003). Foram testadas duas funções básicas de detecção: curva meia-normal e curva taxa-de-risco, além de ajustes de série visando melhorar o ajuste das funções de detecção (cosseno, polinomial simples e polinomial de Hermite).

O melhor modelo foi escolhido com base no menor valor de AIC – Critério de Informação de Akaike (BURNHAM & ANDERSON, 2002), que considera o bom ajuste do modelo aos dados e penaliza pelo número de parâmetros no modelo. A diferença no AIC do melhor modelo ($\Delta AIC = 0$) para os outros modelos, que constitui o ΔAIC , determina quais modelos são mais plausíveis. Um ΔAIC de até dois indica os modelos que devem ser considerados como os melhores.

Foram consideradas nove variáveis nos modelos para a curva de detecção (**Tabela V.3-1**). O táxon também foi considerado como variável, mas os modelos que incluíram esse fator apresentaram problemas computacionais para estimar alguns parâmetros e, portanto, foram excluídos do conjunto de modelos testados. Como estratégia de modelagem, partiu-se do modelo nulo (mais simples) e posteriormente adicionou-se uma ou no máximo duas covariáveis por modelo.

Tabela V.3-1: Variáveis utilizadas para modelar a curva de detecção durante as Campanhas de Avistagem Embarcada do PMC-BS.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO
MEIO DE DETECÇÃO	Olho nu, Binóculo 7x50, Binóculo 15x50
PISTA DE DETECÇÃO	Borrifo, corpo ou comportamento aéreo
VISIBILIDADE	Péssima, Ruim, Boa, Excelente
TAMANHO DE GRUPO	Número de indivíduos estimado pelos observadores
ESTADO DO MAR	1 a 5 na escala Beaufort como variável contínua ou categórica
REFLEXO DO SOL	Percentual do través até a proa dos dois bordos com reflexo do sol
COBERTURA DE NUVENS	Percentual do céu encoberto
ESTADO DO TEMPO	Bom, parcialmente nublado, nublado sem chuva, chuva fraca
PROFUNDIDADE	Profundidade da detecção em metros

Esforço amostral e detecções de cetáceos

Um total de 367 linhas de transecção percorridas em seis campanhas foi considerado para as análises, totalizando 17.704 milhas náuticas percorridas na área de estudo (**Tabela V.3-2**).

Tabela V.3-2: Esforço amostral e dados sobre avistagens de cetáceos observados durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS. mn = milhas náuticas; DP = desvio padrão.

Campanha	Estação do ano	Linhas de transecção	Esforço (mn)	Grupos			Indivíduos		Tamanho de grupo	
				Cetáceos (total)	Mysticeti	Odontoceti	Total	Indivíduos por mn	Média ± DP	Min - Máx
1	Primavera / verão	57	2.767,2	47	7	36	335	0,121	7,1 ± 10,8	1 - 50
2	Outono	67	2.941,4	76	28	36	1215	0,413	16,0 ± 36,1	1 - 200
3	Primavera	53	2.996,3	115	44	51	499	0,167	4,3 ± 6,7	1 - 40
4	Verão / outono	70	2.988,2	56	7	43	860	0,288	15,4 ± 25,5	1 - 100
5	Inverno / primavera	58	2.957,1	119	72	36	1334	0,451	11,2 ± 65,1	1 - 700
6	Verão	62	3.053,8	68	5	62	1284	0,420	18,9 ± 31,0	1 - 200
TOTAL		367	17.704,0	481	163	264	5527	0,312	11,5 ± 38,8	1 - 700
MÉDIA		61,2	2.950,7	80,2	27,2	44,0	921,2			

Estimativa de densidade e abundância de mysticetos

Para os dados de mysticetos, foram eliminadas todas as observações a uma distância maior que 2.000 metros da linha de transecção. Foi construído um total de 15 modelos para a curva de detecção de mysticetos na Bacia de Santos (**Tabela V.3-3**). O melhor modelo indicado pelo menor valor de AIC tinha como variáveis explanatórias o estado do mar na escala Beaufort (como variável categórica) e a pista de detecção. A faixa amostrada efetivamente estimada por este modelo foi de 722 metros de comprimento. A curva de detecção meia-normal sem covariáveis está representada na **Figura V.3-1**.

Tabela V.3-3: Modelos de detecção para mysticetos na Bacia de Santos em função da distância das linhas de transecção, ordenados pelo menor valor de AIC (Critério de Informação de Akaike). K = número de parâmetros.

Modelo	k	Delta AIC	AIC
Beaufort (categórica) + Pista de detecção	8	0.0	2144.5
Beaufort (categórica)	6	5.9	2150.4
Pista de detecção	3	6.6	2151.1
Nulo – Exponencial negativa	1	11.8	2156.3
Beaufort (contínua)	2	12.6	2157.1
Visibilidade	2	13.2	2157.7
Tamanho de grupo	2	14.1	2158.6
Tempo (contínua)	2	15.6	2160.1
Reflexo	2	16.0	2160.5
Nulo – Meia-normal	1	16.0	2160.5
Nuvens	2	16.1	2160.6
Meio de detecção	3	16.2	2160.7
Nulo – Uniforme	2	16.9	2161.4
Nulo – Taxa de risco	3	17.0	2161.5
Profundidade	2	17.1	2161.6

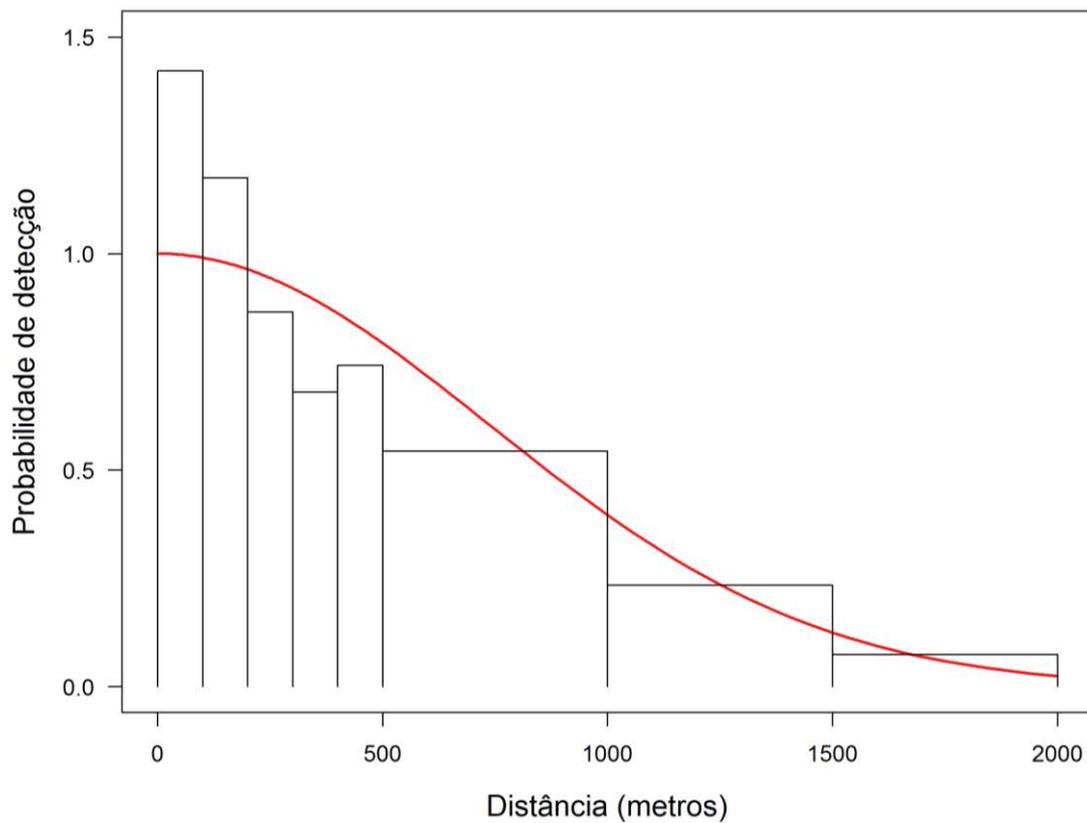


Figura V.3-1: Curva de detecção (linha vermelha) meia-normal de um modelo ajustado aos dados de misticetos observados durante as Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.

A densidade estimada de misticetos variou entre 0,06 a 1,13 indivíduos por 100 km² (**Tabela V.3-4**). A abundância e a densidade de grandes baleias variaram substancialmente entre as campanhas (**Figura V.3-2**), sendo a campanha que abrangeu o inverno (Campanha 5) aquela que apresentou maior abundância, e as campanhas que abrangeram total ou parcialmente o verão (Campanhas 1, 4 e 6) aquelas que apresentaram as menores abundâncias. A precisão das estimativas foi maior nas campanhas com mais avistagens, com CV (coeficiente de variação) menor que 25%.

Tabela V.3-4: Estimativa de densidade e abundância de mysticetos durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS. N = abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.

Campanha	Detecções	Densidade (inds/100km ²)	Densidade IC95%	N Estimativa	N IC 95%	N CV%
1	7	0,12	0,07 – 0,21	329	196 – 551	26,0
2	24	0,40	0,28 – 0,57	1.064	746 – 1.518	18,0
3	38	0,63	0,38 – 1,02	1.648	1.008 – 2.692	24,7
4	7	0,12	0,04 – 0,33	305	108 – 858	54,7
5	68	1,13	0,77 – 1,67	2.990	2.038 – 4.385	19,4
6	4	0,06	0,03 – 0,15	170	72 – 404	44,5

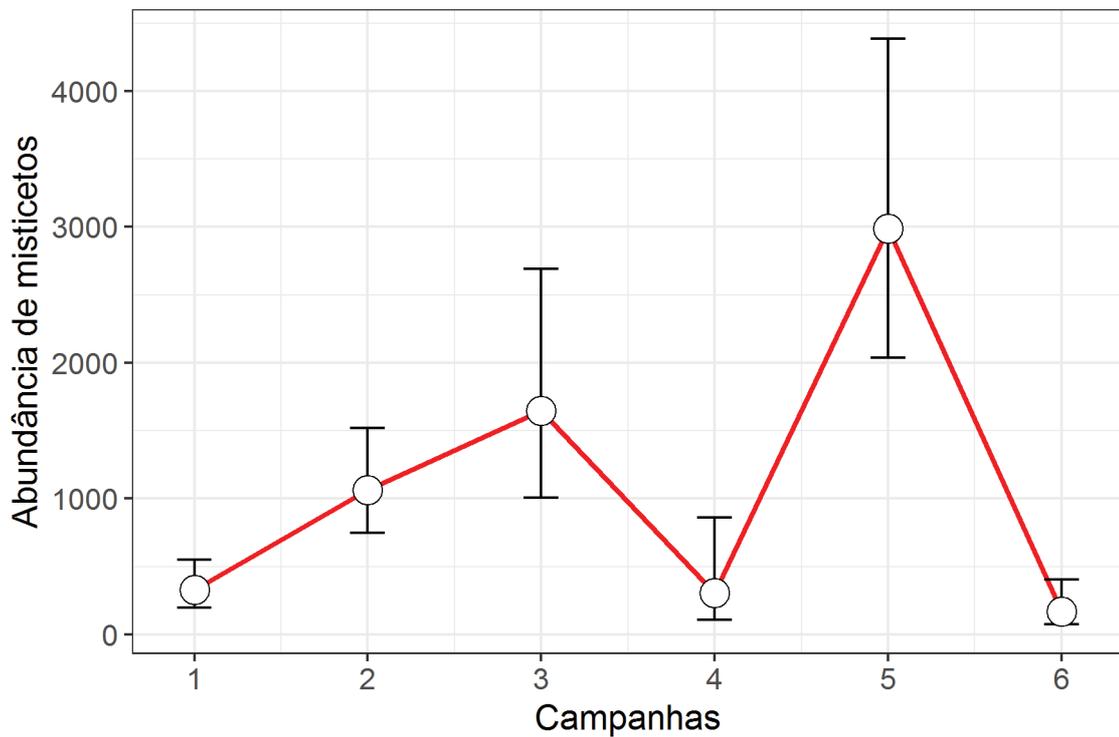


Figura V.3-2: Abundância de misticetos observados ao longo das Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.

Foi feita uma estimativa para a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*), considerando-se as três campanhas em que houve avistagens da espécie (Campanhas 2, 3 e 5). Após a eliminação dos dados a uma distância maior que 2.000 metros, restaram 52 detecções da espécie para gerar as estimativas. O melhor modelo para esta espécie foi o da curva meia-normal com inclusão da covariável estado do mar na escala Beaufort (em escala contínua). Foram feitas estimativas para as três campanhas com avistagens e uma combinada entre a média das estimativas das campanhas, ponderadas pelo esforço em cada campanha (**Tabela V.3-5**). Na Campanha 5, a abundância de *M. novaeangliae* chegou a corresponder a mais da metade (53%) da abundância total de misticetos na Bacia de Santos.

Tabela V.3-5: Estimativa de densidade e abundância da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS. N = estimativa de abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.

Campanha	Detecções	Densidade (inds/100km ²)	Densidade IC95%	N	N IC 95%	N CV%
2	5	0,09	0,03 – 0,26	247	88 - 695	54,1
3	14	0,25	0,13 – 0,48	671	353 – 1.275	32,4
5	33	0,61	0,41 – 0,89	1.596	1090 – 2.335	19,3
TOTAL	52	0,31	0,22 – 0,46	842	585 – 1.212	18,6

Estimativa de densidade de delphinídeos

Para a construção da curva de detecção de delphinídeos, foram eliminadas todas as observações mais distantes de 1.000 metros da linha de transecção. Com base nos dados truncados em mil metros, foram construídos 16 modelos de detecção utilizando diferentes covariáveis (**Tabela V.3-6**). O melhor modelo considerou a visibilidade (em escala contínua) e o meio de detecção como variáveis importantes afetando a distância das detecções. A curva de detecção meia-normal sem covariáveis está representada na **Figura V.3-3**.

Tabela V.3-6: Modelos de detecção para delphinídeos na Bacia de Santos em função da distância das linhas de transecção, ordenados pelo menor valor de AIC (Critério de Informação de Akaike). K = número de parâmetros.

Modelo	k	AIC	Delta AIC
Visibilidade + Meio de detecção	4	0,0	2801,5
Visibilidade	2	16,7	2818,2
Meio de detecção	3	18,8	2820,2
Nulo – Exponencial negativa	1	22,7	2824,2
Nulo – Taxa de risco	2	23,3	2824,8
Tamanho de grupo	2	24,3	2825,7
Nulo – Meia-normal	2	26,8	2828,2
Nulo – Uniforme	3	28,5	2830,0
Beaufort (contínua)	2	28,8	2830,2
Beaufort (ategórica)	7	28,8	2830,2
Pista de detecção	3	34,9	2836,4

Modelo	k	AIC	Delta AIC
Tempo (contínua)	2	36,0	2837,5
Tempo (categórica)	4	36,2	2837,7
Nuvens	2	37,5	2839,0
Reflexo	2	40,5	2841,9
Profundidade	2	41,5	2843,0

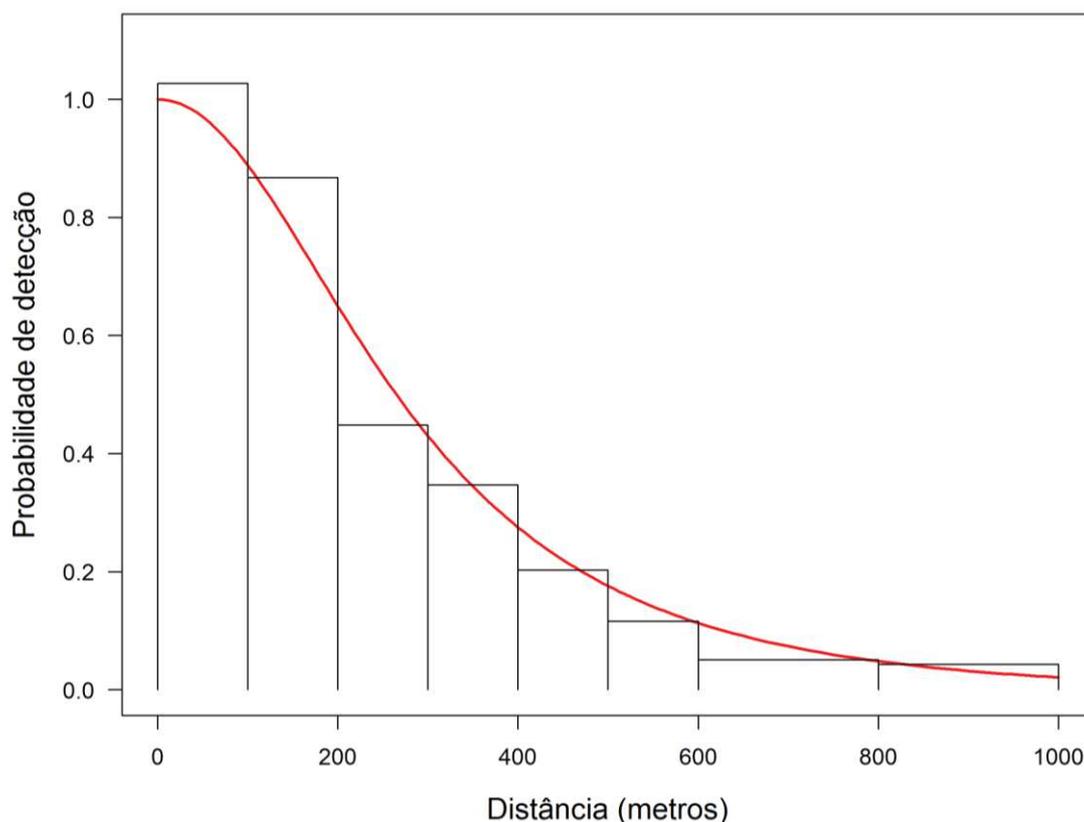


Figura V.3-3: Curva de detecção (linha vermelha) meia-normal de um modelo ajustado aos dados de delfínidos observados durante as Campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC-BS.

As estimativas de densidade e abundância de delfínidos oscilaram de 26 mil a 45 mil indivíduos ao longo das campanhas do PMC-BS (**Tabela V.3-7;** **Figura V.3-4**). As precisões das estimativas foram relativamente boas, com coeficiente de variação sempre menor que 26%.

Tabela V.3-7: Estimativa de densidade e abundância de delfínídeos durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC - BS. Camp = campanha; N = estimativa de abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.

Camp	Detecções	Densidade (inds/100km ²)	Densida de IC95%	N	N IC 95%	N CV%
1	30	11,64	7,2 – 18,63	30.654	19.150 – 49.070	24,1
2	32	11,72	7,3 – 18,78	30.857	19.253 – 49.453	24,1
3	41	14,69	9,9 – 21,7	38.673	26.093 – 57.317	20,1
4	41	14,74	9,8 – 22,2	38.804	25.749 – 58.477	21,0
5	28	10,17	6,2 – 16,8	26.783	16.202 – 44.275	25,7
6	49	17,25	11,5 – 25,9	45.435	30.245 – 68.254	20,8

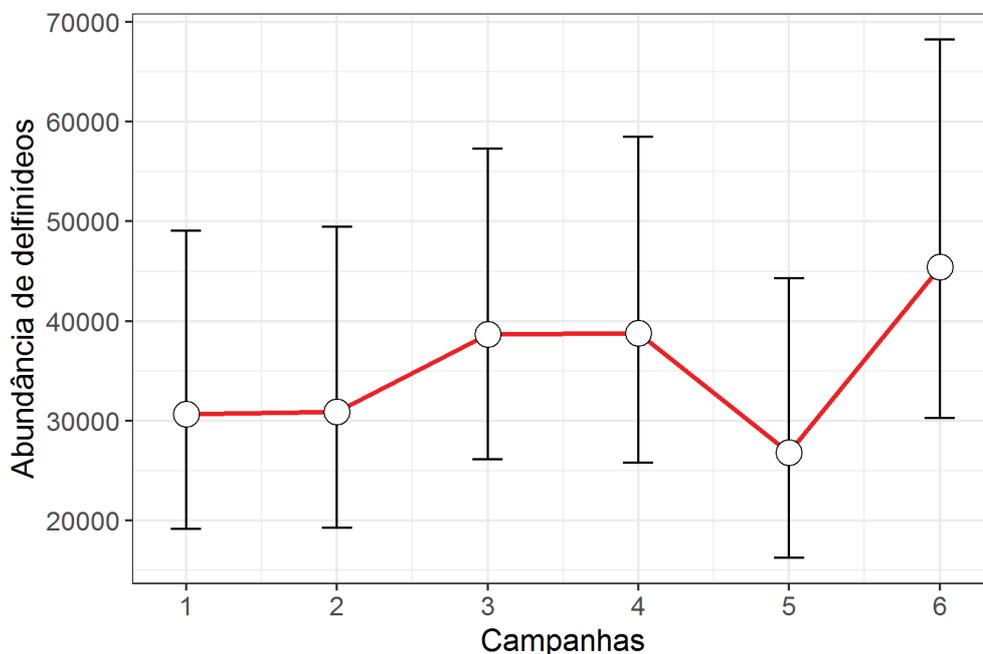


Figura V.3-4: Abundância de delfínídeos observados ao longo das quatro Campanhas de Avistagem Embarcada dos primeiros anos do PMC-BS.

Das espécies de delfínídeos, foi possível estimar a densidade e abundância do golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*). As detecções mais distantes que 800 metros da linha de transecção foram eliminadas para a realização da estimativa. O melhor modelo para *S. frontalis* foi a curva meia-normal considerando a influência do meio de detecção nas distâncias que os grupos foram detectados. A abundância da espécie variou de 11.362 indivíduos na Campanha 3 (CV = 42,7%) a 35.370 indivíduos na Campanha 6 (CV = 43,1%) (Tabela V.3-8). O número de golfinhos dessa espécie variou de 29 a 77% do total de delfínídeos estimados para a Bacia de Santos.

Tabela V.3-8: Estimativa de densidade e abundância do golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*) durante as campanhas de Avistagem Embarcada em três anos do PMC - BS. N = estimativa de abundância; IC = intervalo de confiança; CV = Coeficiente de variação.

Camp	Detecções	Densidade (inds/100km ²)	Densidade IC95%	N	N IC 95%	N CV%
1	7	5,4	1,7 – 17,8	14.360	4.399 – 46.873	63,5
2	9	6,6	3,0 – 14,6	17.423	7.903 – 38.412	40,9
3	6	4,3	1,9 – 9,8	11.362	4.978 – 25.935	42,7
4	15	10,8	6,4 – 18,3	28.501	16.830 – 48.268	27,1
5	6	4,4	1,9 – 10,0	11.522	5.020 – 26.447	43,1
6	19	13,4	6,7 – 26,9	35.370	17.638 – 70.928	35,8
TOTAL	62	7,5	4,7 – 12,0	19.895	12.490 – 31.692	24,0

Discussão sobre densidade e abundância

A abordagem metodológica para as estimativas de densidade usadas

neste relatório foram similares aos dois relatórios anteriores dos anos 1 e 2 do PMC-BS. Basicamente consistiu da construção de curvas de detecção multivariadas, considerando diferentes covariáveis que podem afetar o processo de detecção, especialmente no que tange a distância de detecção dos grupos.

Na parte analítica, alguns aprimoramentos previstos para os próximos anos incluem a estratificação espacial da Bacia de Santos em diferentes habitats, que podem resultar em estimativas com maior precisão e acurácia. Outra abordagem que deverá ser utilizada nos próximos anos é a combinação de estimativas de densidade com modelos de uso de habitat (*Density Surface Modeling*) (MILLER et al., 2013). Assim, espera-se melhorar a qualidade das estimativas utilizando novas abordagens derivadas da metodologia de linhas de transecção com amostragem de distâncias.

Conforme previsto, o maior avanço nestes primeiros três anos de PMC-BS no que tange às estimativas de abundância foi o acúmulo de dados que permitiu estimativas para diferentes grupos de cetáceos (Subordens Mysticeti e Odontoceti). Neste terceiro ano, além da estimativa de densidade e abundância de cachalotes por meio das detecções acústicas (apresentadas nos dois últimos relatórios anuais), os dados permitiram ainda estimativas para duas espécies adicionais, a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) e o golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*). Estas estimativas são pioneiras para a costa brasileira.

A estimativa para os cachalotes (*Physeter macrocephalus*) na Bacia de Santos, de 130 animais (IC95% = 45 - 375), é a primeira estimativa para a espécie realizada na costa brasileira (PETROBRAS, 2017). Ela aponta para uma população pequena de *P. macrocephalus* que usa a Bacia de Santos e realiza deslocamentos para outras regiões, como o sul do Brasil. Estes deslocamentos são evidenciados pelo fato desta espécie não estar sempre presente na região e por um indivíduo que foi marcado com um transmissor satelital, com deslocamento para o sul da área de estudo ao longo do talude continental.

Stenella frontalis foi a espécie mais frequente nas amostragens realizadas

no âmbito do PMC-BC. Os dados apresentados neste item apontam para uma grande abundância desta espécie na Bacia de Santos, perfazendo um total de até 77% dos delfinídeos observados na região e uma abundância média de aproximadamente 20 mil animais.

A estimativa da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) complementa as estimativas realizadas regularmente por meio de sobrevoos na principal área de reprodução, que vai de Cabo Frio até a costa do Estado de Sergipe (ANDRIOLO et al., 2010). As estimativas apresentadas aqui para a espécie mostram que, ao menos, mais 1.500 animais estão presentes em determinadas épocas na Bacia de Santos, ao sul da principal área de reprodução.

As oscilações na abundância entre as campanhas constatadas pelas análises do presente item são importantes de considerar em um monitoramento populacional e podem ser decorrentes de fatores diversos. Para as grandes baleias já se esperava uma oscilação sazonal da abundância em decorrência de seu comportamento migratório e da presença sazonal nas regiões tropicais e subtropicais de reprodução. As campanhas realizadas em período próximo ao verão apresentaram menor abundância, em contraste com as estimativas próximas do inverno e da primavera, cujas abundâncias foram maiores. A única exceção foi a baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*), que esteve presente em todas as épocas do ano e provavelmente não realiza migrações sazonais. Os números de delfinídeos também oscilaram ao longo das campanhas, mas sem uma aparente sazonalidade. Um fator provável é que haja movimentos destes animais para regiões vizinhas (p.ex. Bacia de Campos e Bacia de Pelotas). Esses movimentos provavelmente são determinados por fatores oceanográficos, que condicionam a disponibilidade de presas. Os movimentos e a relação com fatores oceanográficos devem ser investigados ao longo dos próximos anos do PMC-BS para ajudar a explicar as oscilações nas abundâncias observadas.

V.3.2 *Estimativas de densidade de Delphinidae em Campanhas de Avistagem Aérea*

Neste item, dada a configuração de observadores independentes e a velocidade inerentemente elevada das aeronaves, que acarreta em perda de animais que estão indisponíveis por conta do mergulho, focou-se em questões de detectabilidade.

A **Tabela V.3-9** tem as datas de início, término e esforço amostral das seis campanhas. A **Tabela V.3-10** diz respeito aos cetáceos observados. Os dados das avistagens de cetáceos foram separados em quatro categorias a saber: apenas os mysticetos (Misticeto); os odontocetos não identificados a nível de Família (Odontocetos); os odontocetos identificados em nível de Família ou Espécie (Delfinídeos); e cetáceos não identificados (Cetáceos não ID).

Tabela V.3-9: *Datas de início, término e esforço das campanhas executadas até o presente momento.*

Campanha	Início	Término	Estação do ano	Esforço (km)
1	07/12/2015	13/12/2015	Primavera	5.720,00
2	28/03/2016	04/04/2016	Outono	4.874,00
3	21/09/2016	29/09/2016	Primavera	7.326,00
4	30/01/2017	05/02/2017	Verão	6.547,00
5	01/12/2017	11/12/2017	Primavera	5.989,00
6	10/04/2018	27/04/2018	Outono	5.666,00

Tabela V.3-10: Número de grupos de cetáceos registrados nas seis campanhas. A coluna "Odontoceto" reúne todos os grupos de animais não identificados a nível de Família. Frequência relativa está em parênteses depois do número de registros.

Campanha	Misticeto	Odontoceto	Delfinídeos	Cetáceos não ID	TOTAL
1	4 (0,08)	9 (0,18)	31 (0,62)	6 (0,12)	50 (1,00)
2	11 (0,15)	21 (0,29)	36 (0,49)	5 (0,07)	73 (1,00)
3	21 (0,37)	4 (0,07)	28 (0,50)	3 (0,05)	56 (1,00)
4	4 (0,17)	4 (0,17)	14 (0,61)	1 (0,04)	23 (1,00)
5	11 (0,19)	6 (0,10)	40 (0,68)	2 (0,03)	59 (1,00)
6	9 (0,11)	15 (0,18)	49 (0,58)	11 (0,13)	84 (1,00)
TOTAL	60 (0,17)	59 (0,17)	198 (0,57)	28 (0,08)	345 (1,00)

A informação da dupla observação por grupo de cetáceo está organizada da seguinte forma: animais avistados pelo primeiro observador (Obs1); pelo segundo observador (Obs2) e avistados por ambos os observadores simultaneamente (Ambos) (**Tabela V.3-11** a Erro! Fonte de referência não encontrada.). Também é informada a taxa de recaptura bruta entre os observadores (TR), que é calculada pela divisão dos grupos avistados por ambos observadores pelo número de grupos total.

Tabela V.3-11: Grupos de Delfinídeos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR).

Delfinídeos					
Campanha	Total_Ob	Obs1	Obs2	Ambos	TR
1	31	13	11	7	0,23
2	36	7	9	20	0,56
3	28	6	12	10	0,36
4	14	6	5	3	0,21
5	40	23	13	4	0,10
6	49	21	14	14	0,29

Tabela V.3-12: Grupos de Odontocetos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR).

Odontocetos					
Campanha	Total_Ob	Obs1	Obs2	Ambos	TR
1	40	17	16	7	0,18
2	57	14	16	27	0,47
3	32	7	14	11	0,34
4	18	6	9	3	0,17
5	46	26	15	5	0,11
6	64	29	17	18	0,28

Tabela V.3-13: Grupos de Cetáceos observados nas seis campanhas. Da segunda à sexta coluna está discriminado o total dos grupos observados (Total_Ob); grupos observados pelo observador 1 (Obs1); observador 2 (Obs2); ambos os observadores (Ambos); e a taxa de recaptura total (TR).

Cetáceos					
Campanha	Total_Ob	Obs1	Obs2	Ambos	TR
1	50	24	19	7	0,14
2	73	24	20	29	0,40
3	56	13	24	19	0,34
4	23	8	11	4	0,17
5	59	31	19	9	0,15
6	84	37	25	22	0,26

Estimativa de abundância de cetáceos por sobrevoos

Para a obtenção da estimativa de abundância dos dados do sobrevoo, lançou-se mão dos modelos Logit e Probit já empregados nas análises dos dois primeiros anos. Semelhante ao *Distance Sampling*, a estrutura desses modelos considera basicamente a distância perpendicular entre a transecção e o indivíduo avistado. Todavia, acrescenta a informação de um segundo observador (dupla observação) (BORCHERS, 1999; ROYLE & DORAZIO, 2008). Isso permite estimar e não fixar um valor para a probabilidade de

detecção na linha de transecção - $g(0)$.

Esses dados foram usados para estimar o número de grupos; a taxa de reavistagem prevista à distância x ; e a probabilidade de se avistar um animal sobre a linha de transecção - $g(0)$. De posse das estimativas de $g(0)$ elaboraram-se as curvas de detecção para os observadores em cada campanha. Como exemplo, a curva da probabilidade de detecção do primeiro e do segundo observador para delphinídeos, odontocetos e cetáceos da 6ª Campanha foi plotada (**Figura V.3-5**).

Também foi possível calcular a probabilidade dos cetáceos não serem avistados ou à probabilidade de perda, do primeiro ($1 - g_{obs1}(0)$) e do segundo observador ($1 - g_{obs2}(0)$) (Erro! Fonte de referência não encontrada.).

Posteriormente, após se calcular o tamanho médio de grupo, diretamente dos dados de campo, para cada uma das seis campanhas (Erro! Fonte de referência não encontrada.), procedeu-se a estimativa de abundância sumarizada na **Tabela V.3-14** e na **Figura V.3-6** e **Figura V.3-7**.

Tabela V.3-14: Média, desvio padrão e coeficiente de variação a posteriori das taxas de perda ou probabilidade de não detecção dos animais para o primeiro observador - $g_{obs1}(0)$ - e segundo observador - $g_{obs2}(0)$ - considerando cada uma das seis campanhas.

Campanha	Observadores	media	sd	CV
1	$1 - g1(0)$	0,486	0,160	0,329
	$1 - g2(0)$	0,829	0,087	0,105
2	$1 - g1(0)$	0,123	0,041	0,334
	$1 - g2(0)$	0,306	0,095	0,310
3	$1 - g1(0)$	0,343	0,110	0,321
	$1 - g2(0)$	0,284	0,098	0,346
4	$1 - g1(0)$	0,503	0,195	0,388
	$1 - g2(0)$	0,326	0,173	0,531
5	$1 - g1(0)$	0,311	0,145	0,467
	$1 - g2(0)$	0,703	0,113	0,160
6	$1 - g1(0)$	0,486	0,160	0,329
	$1 - g2(0)$	0,829	0,087	0,105

Curva de Detectabilidade – Campanha-6

Logit

Probit

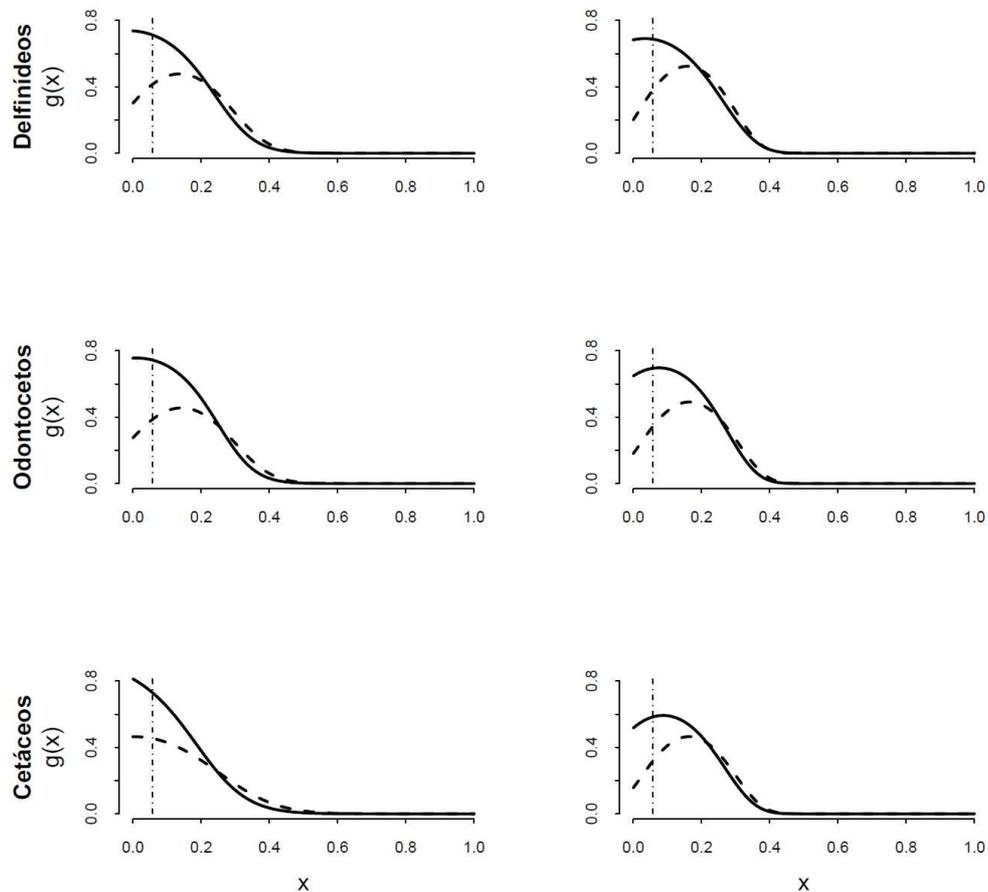


Figura V.3-5: Curva de detecção dos Modelos Logit e Probit para a 6ª Campanha de Avistagem Aérea. Curvas representam a probabilidade de detecção do primeiro observador (linhas sólidas) e do segundo observador (linhas tracejadas). As linhas tracejadas verticais representam o retículo 50.

Tabela V.3-15: Média, desvio padrão e coeficiente de variação para tamanho médio de grupo obtidos a partir dos dados de campo para cada uma das seis Campanhas de Avistagem Aérea do PMC-BS.

Campanha	média	sd	CV
1	15,75	69,88	4,44
2	35,11	82,02	2,34
3	16,02	34,07	2,13
4	14,92	28,38	1,9
5	13,34	28,47	2,13
6	14,29	34,54	2,42

Distribuições Posteriores da Abundância estimadas pelos Modelos Logit

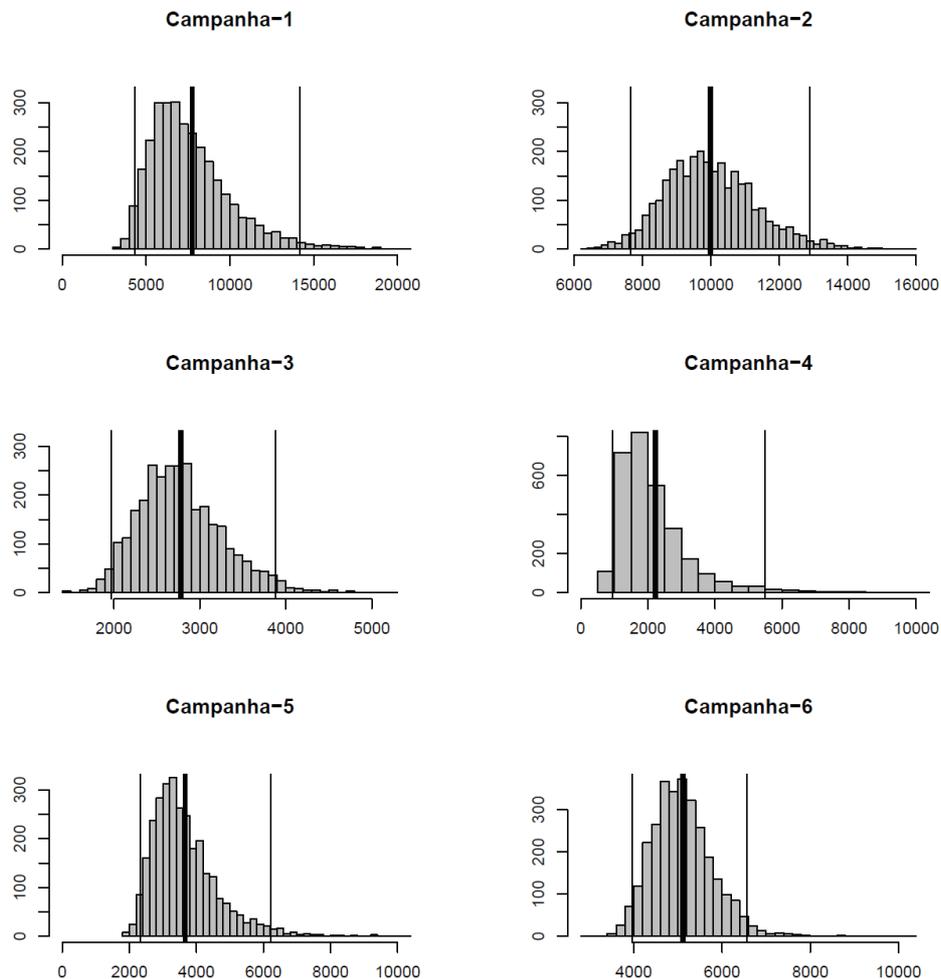


Figura V.3-6: Histograma da distribuição posterior da estimativa de abundância de cetáceos para os dados das seis campanhas. As linhas verticais sólidas e tracejadas representam, respectivamente, as médias e o intervalo de credibilidade de 95%, obtidas pelo modelo Logit.

Distribuições Posteriores da Abundância estimadas pelos Modelos Probit

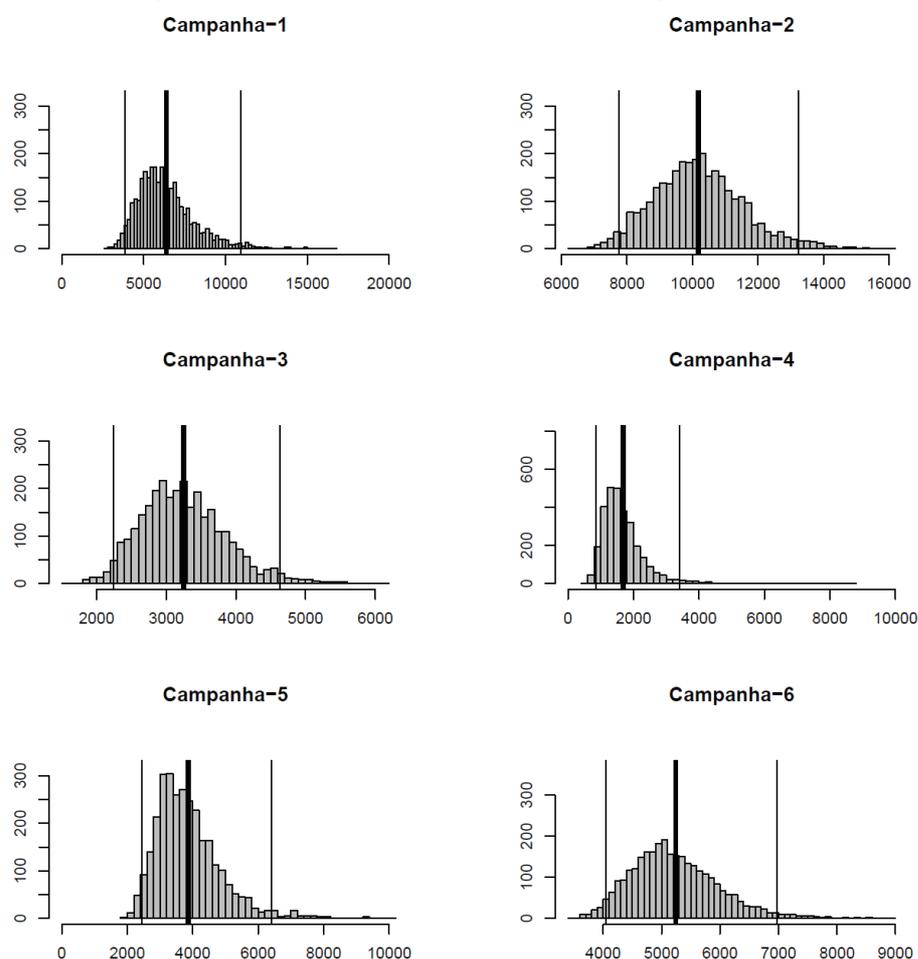


Figura V.3-7: Histograma da distribuição posterior da estimativa de abundância de cetáceos para os dados das seis campanhas. As linhas verticais sólidas e tracejadas representam, respectivamente, as médias e o intervalo de credibilidade de 95%, obtidas pelo modelo Probit.

Tabela V.3-16: Média e desvio padrão posteriores; coeficiente de variação; quantis (0,025, 0,5 e 0,975) e DICs para a estimativa da abundância de Cetáceos feita pelos Modelos Logit e Probit com os dados de cada uma das seis campanhas.

Campanha	Modelo Logit							Modelo Probit						
	média	dp	CV	2,5%	50%	97,5%	DIC	média	dp	CV	2,5%	50%	97,5%	DIC
1	7.753	2.730	0,35	4.316	7.198	14.175	872	6.390	1.795	0,28	3.843	6.095	10.915	715
2	9.995	1.332	0,13	7.653	9.865	12.886	541	10.190	1.364	0,13	7.759	10.111	13.236	539
3	2.779	496	0,18	1.970	2.723	3.876	718	3.249	616	0,19	2.242	3.187	4.629	741
4	2.230	1.370	0,61	940	1.909	5.490	508	1.676	677	0,40	850	1.536	3.416	351
5	3.663	1.055	0,29	2.321	3.441	6.229	1.092	3.860	1.007	0,26	2.454	3.682	6.403	972
6	5.105	693	0,14	3.957	5.043	6.571	819	5.241	759	0,14	4.043	5.157	6.972	913

Discussão sobre estimativas por sobrevoo

As estimativas de número de grupos apresentaram resultados decrescentes até a quinta campanha, quando, a partir de então, passaram a esboçar valores crescentes. No caso dos mysticetos, sabe-se que esses animais são sazonais (CLAPHAM et al., 1993; CLAPHAM, 2000) e que migram periodicamente entre regiões de baixa e alta latitudes com o intuito respectivo de reprodução e alimentação (MORETE et al., 2008). No caso de delphinídeos, a sazonalidade pode estar vinculada à procura de regiões de maior produtividade (DI TULLIO et al., 2016). Para uma área de estudo dessas proporções, como a Bacia de Santos, as respostas comportamentais frente a mudanças ambientais e ecológicas, como por exemplo, uma migração em decorrência da produtividade primária, são prováveis (LEARMONTH et al., 2006; PINET, 2009; TRUJILLO & THURMAN, 2011).

Como um subproduto do gzero (Erro! Fonte de referência não encontrada. e Erro! Fonte de referência não encontrada.), apresentamos a probabilidade de o observador perder um animal sobre a linha de transecção. Essas informações podem auxiliar os pesquisadores que fazem uso de modelos, cuja função de detectabilidade seja do tipo Meia-Normal, Taxa-de-risco ou Gamma (BECKER & QUANG, 2009), a estabelecerem os valores a serem usados nas respectivas funções para a obtenção de suas estimativas.

Os modelos bayesianos usados foram robustos em considerar a detecção imperfeita deste tipo de plataforma amostral. Observou-se que ambos os observadores das janelas plana e bolha possuem elevadas probabilidades de perda de animais, mesmo a distâncias próximas da linha de transecção.

Além disto, percebeu-se a capacidade dos modelos em se ajustar a circunstâncias até então não consideradas, como as chamadas áreas de sombra sob a aeronave. Ao se observar as curvas de detecção da sexta campanha, usada como exemplo, percebe-se a existência de uma região em torno de uma distância perpendicular x entre a linha de transecção e o animal observado, em que $x > 0$ e cuja probabilidade de detecção é maior que sobre a linha de transecção, ($x = 0$), onde se acredita que haja a máxima probabilidade

de detecção.

A impossibilidade de modelar tais áreas de sombra muitas vezes leva o pesquisador a descartar a informação, ou mesmo, considerar curvas de detecção com viés para gerar as estimativas. As curvas de detecção podem ser resultado simultâneo da acurácia dos observadores; redução do campo de visão; estado do mar e disponibilidade de animais na área amostrada.

A estimativa de abundância *a posteriori* foi obtida para os cetáceos, o grupo de maior n-amostral. Na análise dos valores das médias e dos desvios padrão, observa-se que a diferença entre os modelos Logit e Probit é pequena, sem relevância para a utilização de um ou outro modelo na estimativa de abundância. Isso fica ainda mais evidente na análise dos coeficientes de variação e DICs desses modelos. Assim, estima-se uma abundância para a área amostrada em torno de 5.200 animais.

V.3.3 *Diversidade genética*

A diversidade genética é um componente importante da biodiversidade e é requerida para a população se adaptar às mudanças ambientais, isto é, representa seu potencial evolutivo (FRANKHAM et al., 2010). Os níveis de diversidade genética dentro das espécies são determinados pela interação entre a seleção natural e deriva genética, influenciada pelo isolamento geográfico, sistemas de acasalamento e tamanho da população. Contudo, a perda da diversidade genética em espécies e populações é considerada uma das principais ameaças e pode aumentar o risco de extinção, principalmente para as espécies de cetáceos que estão atualmente expostas a uma variedade de impactos antropogênicos, e são vulneráveis à degradação do habitat e às mudanças climáticas.

Durante os três anos do PMC-BS, os níveis de diversidade genética mitocondrial e nuclear foram estimados para cada espécie de cetáceo amostrada na Bacia de Santos, com um número amostral mínimo de cinco indivíduos. A identificação de amostras duplicadas (reamostragem ou recaptura

do mesmo indivíduo) foi baseada na combinação da identificação individual através dos genótipos (Ver abaixo), na sequência do DNAm_t e no sexo do indivíduo. Essas amostras duplicadas não foram incluídas nas análises seguintes. O número de haplótipos e os índices de diversidade genética para o DNA mitocondrial (DNAm_t), como diversidade haplotípica (h), nucleotídica (π) e frequência de haplótipos, foram estimados usando o programa DNASP 6.12.1 (ROZAS et al., 2017). Tanto os índices citados quanto o número de haplótipos refletem a diversidade genética dos animais amostrados e, portanto, refletem a saúde da população de um ponto de vista genético.

Um total de 45 amostras do golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) foi obtido durante os três anos do PMC-BS, sendo que, dessas, 44 forneceram sequências de alta qualidade para a região controle do DNAm_t. Após a remoção de duas amostras duplicadas, o alinhamento de 42 sequências (675 pares de base) resultou em 14 haplótipos definidos por 33 sítios polimórficos. Das 67 amostras do golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) e das 46 amostras do golfinho-rotador (*S. longirostris*) foi removida uma amostra duplicada de cada espécie. Posteriormente, os alinhamentos das sequências (685 e 686 pares de base, respectivamente) da região controle do DNAm_t resultaram em 12 e 25 haplótipos definidos por 17 e 37 sítios polimórficos, respectivamente para cada espécie (**Tabela V.3-17**).

Enquanto o alinhamento das sequências (698 pares de base) da região controle do DNAm_t das 12 amostras do golfinho-pintado-pantropical (*S. attenuata*) resultou em quatro haplótipos definidos por 13 sítios polimórficos, o das sequências (684 pares de base) de sete amostras do golfinho-Clymene (*S. clymene*) resultou em seis haplótipos definidos por 18 sítios polimórficos. As comparações das sequências consensos alinhadas (696 e 659 pares de base, respectivamente) das oito amostras do golfinho-comum-de-bico-curto (*D. delphis*) e das oito amostras do golfinho-de-dentes-rugosos (*S. bredanensis*) resultaram em cinco e três haplótipos, respectivamente, ambos definidos por cinco sítios polimórficos. Já para as cinco amostras do golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), o alinhamento das sequências (700 pares de base) da região controle do DNAm_t resultou em quatro haplótipos definidos por

sete sítios polimórficos (**Tabela V.3-17**).

Um total de 13 amostras de baleia-sei (*B. borealis*) foi obtido e o alinhamento das sequências (708 pares de base) da região controle do DNAm resultou em 10 haplótipos definidos por 16 sítios polimórficos. Para as 12 amostras de baleia-de-Bryde (*B. brydei*), o alinhamento das sequências (677 pares de base) resultou em três haplótipos definidos por seis sítios polimórficos (**Tabela V.3-17**).

Tanto para as cinco amostras (após remoção de uma duplicada) de baleia-fin (*B. physalus*) quanto para as cinco de baleia-minke-Antártica (*B. bonaerensis*), os alinhamentos das sequências (694 e 720 pares de base, respectivamente) do DNAm resultaram em cinco haplótipos definidos por 12 e 22 sítios polimórficos, respectivamente (**Tabela V.3-17**). Foram obtidas seis amostras de baleia-azul (*B. musculus*), sendo que cinco foram do mesmo indivíduo. Após a remoção das amostras duplicadas, as duas sequências restantes (725 pares de base) da região controle do DNAm resultaram em dois haplótipos definidos por 19 sítios polimórficos.

Das 21 amostras de baleias-jubarte (*M. novaeangliae*), três foram duplicadas e uma teve a sequência de DNAm descartada devido à baixa qualidade da amplificação. Portanto, das 17 sequências restantes (688 pares de base), foram identificados 14 haplótipos baseados em 32 sítios polimórficos (**Tabela V.3-17**), sendo que 13 já haviam sido previamente encontrados nessa população de baleias-jubarte que frequenta o litoral brasileiro, considerada estoque reprodutivo A (CYPRIANO-SOUZA et al., 2017).

A **Tabela V.3-17** apresenta as diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) para cada espécie, com um número amostral mínimo de 5 indivíduos. Dentre as espécies de odontocetos bem amostradas ($n > 10$ amostras), *S. longirostris* foi aquela que apresentou a maior diversidade haplotípica ($h = 0,958$) e nucleotídica ($\pi = 1,63\%$), seguida de *T. truncatus* e *S. frontalis*. Já para os mysticetos, enquanto *M. novaeangliae* e *B. borealis* apresentaram uma diversidade genética elevada, *B. brydei* apresentou uma baixa diversidade haplotípica ($h = 0,318$) e nucleotídica ($\pi = 0,16\%$).

Tabela V.3-17: Diversidade do DNA mitocondrial das espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. *n* = número de amostras, Seq. (pb) = sequência em pares de bases, S = sítios polimórficos, H = haplótipos, *h* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica (%).

Espécie	n	Seq. (pb)	S	H	h	π %
<i>Tursiops truncatus</i>	42	675	33	14	0,887	1,29
<i>Stenella frontalis</i>	66	685	17	12	0,853	0,54
<i>Stenella longirostris</i>	45	686	37	25	0,958	1,63
<i>Stenella attenuata</i>	12	698	13	4	0,742	0,61
<i>Stenella clymene</i>	7	684	18	6	0,952	1,03
<i>Delphinus delphis</i>	8	696	5	5	0,857	0,22
<i>Steno bredanensis</i>	8	659	5	3	0,679	0,36
<i>Sotalia guianensis</i>	2	704	-	1	-	-
<i>Physeter macrocephalus</i>	4	731	3	2	-	-
<i>Peponocephala electra</i>	5	700	7	4	0,900	0,48
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	1	696	-	1	-	-
<i>Orcinus orca</i>	1	668	-	1	-	-
<i>Balaenoptera musculus</i>	2	725	19	2	-	-
<i>Balaenoptera physalus</i>	5	694	12	5	1,000	0,83
<i>Balaenoptera borealis</i>	13	708	16	10	0,949	0,83
<i>Balaenoptera brydei</i>	12	677	6	3	0,318	0,16
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	5	720	22	5	1,000	1,37
<i>Megaptera novaeangliae</i>	17	690	32	14	0,978	1,34
<i>Eubalaena australis</i>	1	682	-	1	-	-

Após a identificação dos alelos dos locos de microssatélites de cada amostra para cada espécie (ver **Item II.5** do Resumo das Atividades, esforço e tamanho amostral para genética), o programa MICRO-CHECKER, versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi usado para identificar possíveis alelos nulos (alelos não amplificados) e erros de genotipagem. Como o programa analisa dados com um número amostral mínimo de 10 indivíduos, somente os locos das amostras de *T. truncatus* (*n* = 45), *S. frontalis* (*n* = 67), *S. longirostris* (*n* = 46), *S. attenuata* (*n* = 12), *M. novaeangliae* (*n* = 20), *B. borealis* (*n* = 13) e *B. brydei* (*n* = 12) foram analisados. Nenhuma evidência de erro de genotipagem foi encontrada nos locos analisados para as sete espécies. Houve indicação de alelo nulo para o loco D08 em *T. truncatus*, *S. frontalis* e *S.*

attenuata, para o loco TexVet5 em *T. truncatus* e *S. longirostris*, e para o loco TexVet7 em *S. frontalis* e *S. attenuata*, mas esses locos não foram excluídos das análises posteriores porque sua remoção não afeta os resultados.

A identidade de genótipos (identificação individual) foi investigada por meio do programa GENEAP (WILBERG & DREHER, 2004), o qual compara cada genótipo de multilocos individuais com todos os outros genótipos para determinar aqueles que são idênticos (recaptura ou repetição). O programa também calcula a probabilidade de identidade ($P_{(ID)}$ e $P_{(ID)sib}$) e cria histórias de captura.

Foram identificados três genótipos idênticos entre as amostras de baleia-jubarte. O primeiro caso foi entre as amostras GM1 e GM2 coletadas no litoral norte de Santa Catarina, as quais apresentaram o mesmo haplótipo (HGA002) de DNAm e o mesmo sexo (macho), confirmando a reamostragem do mesmo indivíduo. Os outros dois casos foram entre as amostras G146 e G147, coletadas de um macho (haplótipo HBA002) no dia 20 de julho de 2017, sendo uma delas (G146) amostra de pele coletada na água, e entre as amostras G156 e G157 coletadas de outro macho (haplótipo HBA049) no dia 24 do mesmo mês, ambas durante a mesma avistagem.

Um genótipo idêntico foi também identificado entre duas amostras (G129 e G130) de um macho (haplótipo HBP3) de baleia-fin, confirmando a reamostragem do indivíduo durante a mesma avistagem. As cinco amostras (G160 a G164) de pele de baleia-azul coletadas na água, no dia 27 de julho de 2017, também apresentaram o mesmo genótipo, o mesmo haplótipo (HBM2) de DNAm e o mesmo sexo (macho), o que confirma que pertencem ao mesmo indivíduo.

Para os odontocetos foi identificado um genótipo idêntico entre duas amostras (G204 e G205) de pele de cachalote (*Physeter macrocephalus*), coletadas na água no dia 20 de novembro de 2017, as quais apresentaram o mesmo haplótipo (HPM1) de DNAm e o mesmo sexo (fêmea), confirmando a reamostragem do indivíduo. Outros casos de reamostragem foram identificados entre duas amostras (G200 e G201) de um macho (haplótipo HSF2) de *Stenella frontalis* e entre as amostras (G208 e G209 com haplótipo HT4, e

G239 e G240 com haplótipo HT12) de dois machos de *T. truncatus*. Todas as reamostragens ocorreram durante a mesma avistagem.

Houve apenas um caso de recaptura de uma fêmea de *S. longirostris* que foi amostrada pela primeira vez (amostra G215) no dia 08 de fevereiro de 2018 em um grupo de 800 indivíduos e foi reamostrada (amostra G246) após 56 dias (dia 05 de abril) em um grupo misto de *S. longirostris* e *S. clymene*. Não foram identificados genótipos idênticos entre as amostras das outras espécies, portanto, os genótipos das 271 amostras de cetáceos coletadas na Bacia de Santos correspondem a 259 indivíduos diferentes.

Finalmente, a diversidade genética nuclear foi estimada para as espécies com um número amostral mínimo de cinco indivíduos. Além disso, essas análises foram realizadas para as amostras contendo mais de seis locos de microssatélites. Portanto, a diversidade genética nuclear foi estimada como número de alelos por loco (K), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_E), supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos locos, usando os programas CERVUS, versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). A **Tabela V.3-18** apresenta o número de alelos por loco (K) para cada espécie, exceto as três espécies (*G. macrorhynchus*, *O. orca* e *E. australis*) que têm uma única amostra. A maioria dos locos foi polimórfica para todas as espécies.

Tabela V.3-18: Diversidade dos locos de microsatélites para as espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. *n* = número de amostras, *k* = número de alelos por loco.

	<i>T. truncatus</i>			<i>S. longirostris</i>			<i>S. frontalis</i>			<i>S. attenuata</i>	
Loco	n	K	Loco	n	k	Loco	N	k	Loco	n	k
EV1	42	10	EV1	45	14	EV1	65	21	EV1	12	7
EV14	42	14	EV14	45	14	EV14	65	12	EV14	12	11
KWM2a	43	13	EV37	45	14	EV37	64	9	EV37	12	10
KWM12a	42	7	EV94	45	16	EV94	66	7	EV94	12	12
TexVet5	43	9	KWM12a	44	8	KWM2a	62	10	KWM2a	12	8
TexVet7	42	7	TexVet5	45	8	KWM12a	66	9	KWM12a	12	7
MK6	40	19	TexVet7	45	6	TexVet5	66	12	TexVet5	12	6
D08	40	9	MK6	45	15	TexVet7	66	6	TexVet7	12	4
			D08	45	13	MK6	64	8	MK6	12	12
						D08	66	14	D08	12	9
	<i>S. clymene</i>			<i>D. delphis</i>			<i>S. bredanensis</i>			<i>S. guianensis</i>	
Loco	n	K	Loco	n	k	Loco	N	k	Loco	n	K
EV1	7	6	EV1	8	9	EV1	7	3	EV14	2	1
EV14	6	7	EV37	8	6	EV14	8	3	EV37	2	2
EV37	6	9	KWM2a	8	7	EV37	8	7	EV94	2	1
EV94	6	9	KWM12a	8	4	EV94	8	7	KWM2a	2	2
KWM2a	7	9	TexVet5	8	4	KWM12a	8	3	KWM12a	2	2
KWM12a	7	8	TexVet7	8	5	TexVet5	8	4	TexVet5	2	2
TexVet5	7	3	MK6	8	8	TexVet7	8	2	TexVet7	2	1
TexVet7	7	5	D08	8	3	MK6	8	1	MK6	2	2

	<i>T. truncatus</i>			<i>S. longirostris</i>			<i>S. frontalis</i>			<i>S. attenuata</i>	
Loco	n	K	Loco	n	k	Loco	N	k	Loco	n	k
MK6	5	4				D08	8	6	D08	2	1
D08	7	7									
	<i>B. musculus</i>			<i>B. borealis</i>			<i>B. physalus</i>			<i>M. novaeangliae</i>	
Loco	n	K	Loco	N	k	Loco	N	K	Loco	n	k
EV1	2	3	EV1	13	13	EV1	5	9	EV1	17	3
EV14	2	4	EV14	13	13	EV14	5	6	EV37	17	12
EV37	2	4	EV37	13	11	EV37	5	4	EV94	17	13
EV94	2	1	EV94	13	9	EV94	5	9	EV96	10	9
EV96	2	3	EV96	13	9	EV96	5	7	GATA28	17	7
GATA28	2	3	GATA28	13	8	GATA28	5	7	GATA53	17	8
GATA53	2	1	GATA53	13	2	GATA417	5	4	GATA417	17	10
GATA417	2	3	GATA417	13	9	GT23	5	6	464	17	6
GT23	2	3	GT23	13	10	GATA53	3	2	417	17	14
	<i>B. brydei</i>			<i>B. bonaerensis</i>			<i>P. macrocephalus</i>			<i>P. electra</i>	
Loco	n	K	Loco	n	k	Loco	N	K	Loco	n	k
EV1	11	3	EV1	5	3	EV1	4	4	EV1	5	4
EV14	11	5	EV14	5	7	EV14	4	3	EV14	5	4
EV37	9	1	EV37	5	6	EV37	4	4	EV37	5	4
EV94	11	2	EV94	5	6	EV94	4	3	EV94	5	4
EV96	10	3	EV96	5	9	GATA28	4	3	GATA53	5	4
GATA28	11	5	GATA28	5	6	GATA53	4	4	KWM2a	5	7
GATA53	10	3	GATA417	5	9	GATA417	4	3	KWM12a	5	4

	<i>T. truncatus</i>			<i>S. longirostris</i>			<i>S. frontalis</i>			<i>S. attenuata</i>	
Loco	n	K	Loco	n	k	Loco	N	k	Loco	n	k
GATA417	11	6	GT23	5	8	GT23	3	2	MK6	5	1
GT23	10	3	GATA53	4	5	TexVet5	4	4	D08	5	6
						464	3	2			

A **Tabela V.3-19** apresenta o número médio de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) para as 13 espécies (*T. truncatus*, *S. frontalis*, *S. longirostris*, *S. attenuata*, *S. clymene*, *D. delphis*, *S. bredanensis*, *P. electra*, *B. brydei*, *B. borealis*, *B. physalus*, *B. bonaerensis* e *M. novaeangliae*) com um número amostral mínimo de 5 indivíduos. Dentre as quatro espécies de odontocetos com maior número de amostras ($n > 10$ amostras), o número de alelos por loco variou de 4 (TexVet7) em *S. attenuata* a 19 (MK6) em *T. truncatus*. Entretanto, *S. longirostris* apresentou o maior número médio de alelos por loco ($A = 12,00$) e *S. frontalis* apresentou a maior heterozigosidade média observada ($H_o = 0,754$).

Para os três mysticetos bem amostrados, o número de alelos por loco variou (exceto o loco EV37 de *B. brydei* que foi monomórfico) de 2 (EV94 em *B. brydei*, e GATA53 em *B. borealis* e *B. physalus*) a 14 (417) em *M. novaeangliae*. Enquanto *B. borealis* foi a espécie de mysticeto com maior diversidade genética nuclear, com o número médio de alelos por loco de 9,33 e heterozigosidade média observada de 0,760, *B. brydei* apresentou a menor diversidade, com o número médio de alelos por loco de 3,44 e heterozigosidade média observada de 0,427.

Tabela V.3-19: Diversidade dos locos de microsatélites para espécies de cetáceos amostradas na Bacia de Santos. n = número de amostras, N = número de locos, A = número médio de alelos por loco, H_o = heterozigidade observada, H_E = heterozigidade esperada, $P_{(ID)}$ e $P_{(ID)sib}$ = probabilidades de identidade.

Espécie	n	N	A	H_o	H_E	$P_{(ID)}$	$P_{(ID)sib}$
<i>Tursiops truncatus</i>	43	8	11,00	0,719	0,825	$4,74 \times 10^{-11}$	$2,54 \times 10^{-4}$
<i>Stenella frontalis</i>	66	10	10,80	0,754	0,820	$1,72 \times 10^{-13}$	$3,26 \times 10^{-5}$
<i>Stenella longirostris</i>	45	9	12,00	0,705	0,794	$5,59 \times 10^{-13}$	$1,12 \times 10^{-4}$
<i>Stenella attenuata</i>	12	10	8,60	0,775	0,831	$3,51 \times 10^{-13}$	$4,31 \times 10^{-5}$
<i>Stenella clymene</i>	7	10	6,70	0,751	0,845	$1,73 \times 10^{-12}$	$5,70 \times 10^{-5}$
<i>Delphinus delphis</i>	8	8	5,75	0,578	0,737	$2,77 \times 10^{-8}$	$1,22 \times 10^{-3}$
<i>Steno bredanensis</i>	8	9	4,00	0,492	0,528	$2,57 \times 10^{-6}$	$5,14 \times 10^{-3}$
<i>Peponocephala electra</i>	5	9	4,22	0,688	0,676	$1,43 \times 10^{-7}$	$1,47 \times 10^{-3}$
<i>Balaenoptera physalus</i>	5	9	6,00	0,740	0,837	$1,48 \times 10^{-10}$	$2,37 \times 10^{-4}$
<i>Balaenoptera borealis</i>	13	9	9,33	0,760	0,785	$5,56 \times 10^{-12}$	$1,66 \times 10^{-4}$
<i>Balaenoptera brydei</i>	12	9	3,44	0,427	0,515	$1,65 \times 10^{-5}$	$6,75 \times 10^{-3}$
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	5	9	6,56	0,866	0,887	$1,33 \times 10^{-11}$	$1,22 \times 10^{-4}$
<i>Megaptera novaeangliae</i>	17	9	9,11	0,703	0,747	$9,39 \times 10^{-12}$	$1,58 \times 10^{-4}$

Em geral, as quatro espécies de odontocetos (*T. truncatus*, *S. frontalis*, *S. longirostris* e *S. attenuata*) bem amostradas apresentaram altos níveis de diversidade genética mitocondrial e nuclear, similares aos valores encontrados para essas espécies em outros estudos genéticos (OREMUS et al., 2007; QUEROUIL et al., 2007; 2010; CABALLERO et al., 2013; COURBIS et al., 2014; LOUIS et al., 2014; LOWTHER-THIELEKING et al., 2014; VIRICEL & ROSEL, 2014; COSTA et al., 2015; FRUET et al., 2017).

Essa alta diversidade genética tanto mitocondrial quanto nuclear é característica de grandes populações panmíticas. De fato, esses estudos genéticos têm encontrado maior diversidade genética nas populações oceânicas e menor nas populações costeiras. Por exemplo, FRUET et al. (2017) encontraram maior diversidade genética para os golfinhos-nariz-de-garrafa do ecótipo oceânico ($h = 0,940$ e $\pi = 1,90\%$ para DNAmT, $A = 8,2$ e $H_o = 0,650$ para microssatélites) que para os indivíduos do ecótipo costeiro ($h = 0,702$ e $\pi = 0,90\%$ para DNAmT, $A = 3,3$ e $H_o = 0,260$ para microssatélites). COSTA et al. (2015) também encontraram maior diversidade genética para os *T. truncatus* do grupo 3 que para os indivíduos dos grupos 1 e 2, que pertencem às populações estuarinas residentes.

Da mesma forma, as diversidades genética mitocondrial ($h = 0,940$ e $\pi = 1,20\%$) e nuclear ($A = 13,1$ e $H_o = 0,810$) foram maiores nos indivíduos de *S. frontalis* do grupo oceânico do que nos indivíduos do grupo da plataforma continental ($h = 0,800$ e $\pi = 1,20\%$ para DNAmT, $A = 7,8$ e $H_o = 0,580$ para microssatélites) do oeste do Oceano Atlântico Norte (VIRICEL & ROSEL, 2014). Embora pouco se saiba da estruturação populacional de *S. frontalis* no Brasil, um estudo genético encontrou maior diversidade haplotípica e nucleotídica do DNAmT para a população que ocorre no Sudeste do Brasil quando comparada à população da espécie que ocorre no Caribe (CABALLERO et al., 2013).

Os níveis de diversidade genética de *S. longirostris* ($h = 0,958$ e $\pi = 1,63\%$ para DNAmT, $A = 12$ e $H_o = 0,705$ para microssatélites) da Bacia de Santos foram altos e similares àqueles das populações das ilhas do Arquipélago da

Sociedade, na Polinésia Francesa ($h = 0,920$ e $\pi = 1,59\%$ para DNAmT, $A = 11,92$ e $H_0 = 0,700$ para microssatélites) (OREMUS et al., 2007). Embora os níveis de diversidade genética de *S. attenuata* da Bacia de Santos tenham sido menores que os das outras espécies, a diversidade mitocondrial foi maior ($h = 0,740$ e $\pi = 0,61\%$) e a nuclear ($A = 8,6$ e $H_0 = 0,775$) menor que os níveis encontrados na espécie das ilhas do Havaí ($h = 0,450$ e $\pi = 0,50\%$ para DNAmT, $A = 14,9$ e $H_0 = 0,809$ para microssatélites) (COURBIS et al., 2014).

Dentre as outras quatro espécies de odontocetos que tiveram um baixo número amostral, *S. clymene* apresentou a maior diversidade mitocondrial e nuclear ($h = 0,952$ e $\pi = 1,03\%$ para DNAmT, $A = 6,70$ e $H_0 = 0,751$ para microssatélites) comparada às outras três. *Peponocephala electra* também apresentou uma alta diversidade mitocondrial ($h = 0,900$ e $\pi = 0,48\%$) e uma diversidade nuclear intermediária ($A = 4,22$ e $H_0 = 0,688$), sendo que um dos haplótipos foi compartilhado com o haplótipo H31(KT223078) encontrado em uma amostra de encalhe do Nordeste do Brasil (MARTIEN et al., 2017).

Por outro lado, *S. bredanensis* teve a menor diversidade genética tanto mitocondrial ($h = 0,679$ e $\pi = 0,36\%$) quanto nuclear ($A = 4,00$ e $H_0 = 0,492$), similar ao que foi encontrado para as populações das Ilhas da Sociedade ($h = 0,477$ e $\pi = 0,51\%$) para DNAmT, e Ilhas Samoa ($A = 4,31$ e $H_0 = 0,678$) para microssatélites (ALBERTSON et al., 2016). Interessantemente, os três haplótipos de *S. bredanensis* encontrados na Bacia de Santos não foram compartilhados com os cinco haplótipos encontrados em 42 indivíduos da espécie, amostrados na costa Sul (Rio Grande do Sul, $n = 10$; Santa Catarina, $n = 1$) e Sudeste (Rio de Janeiro, $n = 27$; e Espírito Santo, $n = 4$) do Brasil (DA SILVA et al., 2015).

Com relação às três espécies de mysticetos (*B. borealis*, *B. brydei* e *M. novaeangliae*) bem amostradas, obteve-se alta variabilidade em ambos os marcadores genéticos para as baleias-jubarte amostradas na Bacia de Santos. Como suportado pelo compartilhamento dos haplótipos, essas jubartes fazem parte do estoque reprodutivo A, que apresentou alta diversidade genética mitocondrial e nuclear, similar às outras áreas de reprodução de baleia-jubarte do Hemisfério Sul (CYPRIANO-SOUZA et al., 2017). Embora a caça comercial

tenha reduzido as populações de baleia-jubarte durante o século XX, a ausência de perda da diversidade genética nessas populações deve-se à curta duração do efeito de gargalo de garrafa (~ três gerações, considerando o tempo de geração de 21,5 anos para a espécie, TAYLOR et al., 2007), à longevidade da espécie (provavelmente mais que 70 anos, GABRIELLE et al., 2010) e ao tamanho populacional mínimo absoluto alcançado ($N_{\min} = 500$ em 1950, ZERBINI et al., 2011).

A população de baleia-sei que ocorre na Bacia de Santos, Oceano Atlântico Sul, apresentou diversidade genética mitocondrial ($h = 0,949$ e $\pi = 0,83\%$) e nuclear ($A = 9,33$ e $H_o = 0,760$) maior que as populações que ocorrem no Oceano Atlântico Norte ($h = 0,520$ e $\pi = 1,1\%$ para DNAmT, $A = 6,18$ e $H_o = 0,650$ para 11 locos de microssatélites) e no Pacífico Norte ($h = 0,790$ e $\pi = 3,8\%$ para DNAmT, $A = 7,0$ e $H_o = 0,560$ para 7 locos de microssatélites) (HUIJSER et al., 2018). Esses dados genéticos de baleia-sei são muito importantes devido à escassez de informação sobre a espécie no Atlântico Sul.

Portanto, para investigar a relação entre as baleias-sei da Bacia de Santos e as do Oceano Atlântico Norte, os 10 haplótipos de DNAmT encontrados nessa bacia foram comparados com os 7 haplótipos (números de acesso no GenBank: MH035689 - MH035695) encontrados em 84 indivíduos do Atlântico Norte. O haplótipo Hap_6 (MH035694), detectado em uma única amostra dos Açores, foi diferenciado dos outros seis haplótipos do Atlântico Norte por 12 sítios polimórficos e na genealogia de HUIJSER et al. (2018) agrupou com os haplótipos do Pacífico Norte e um haplótipo da Antártica. Embora até o momento não tenha havido compartilhamento de haplótipos entre os oceanos Atlântico Norte e Sul, os 10 haplótipos encontrados na Bacia de Santos agruparam com o Hap_6, sugerindo que esse haplótipo deve representar uma recente linhagem maternal que migrou do Atlântico Sul. No entanto, mais amostras são requeridas para confirmar tal hipótese.

Já os níveis de diversidade genética mitocondrial ($h = 0,318$ e $\pi = 0,16\%$) e nuclear ($A = 3,44$ e $H_o = 0,427$) para as baleias-de-Bryde amostradas na Bacia de Santos foram muito baixos comparados aos níveis das outras

espécies de baleia e das outras populações de baleia-de-Bryde ($h = 0,750$ e $\pi = 1,0\%$ para DNAmT, $A = 6,60$ e $H_0 = 0,686$ para microssatélites) nos Oceanos Pacífico e Índico (KANDA et al., 2007). Esse resultado corrobora o estudo genético de PASTENE et al. (2015) que encontrou menor diversidade nucleotídica ($\pi = 0,08\%$) para as baleias-de-Bryde que ocorrem no Brasil. Embora esses dados sejam baseados em somente 12 amostras coletadas até o momento na Bacia de Santos, a comparação com os dados de alta diversidade genética da baleia-sei, baseados em apenas 13 amostras, sugere que essa população de baleia-de-Bryde tenha realmente uma baixa diversidade genética. Esse baixo nível de diversidade genética pode ser explicado por vários fatores, como: um evento histórico natural, incluindo recente divergência evolutiva; persistência por longo prazo em um tamanho populacional pequeno; ou um evento antropogênico recente. No entanto, para determinar a causa dessa baixa variabilidade é necessária a análise de um número maior de amostras e marcadores nucleares.

Dos três haplótipos das baleias-de-Bryde da Bacia de Santos, um (HBE1) foi encontrado em 10 indivíduos, sendo cinco amostrados na área oceânica e cinco na área costeira. Os outros dois haplótipos (HBE2 e HBE3) foram encontrados em apenas um indivíduo (G68 amostrado na área oceânica e G107 amostrado na área costeira, respectivamente). Interessantemente, o haplótipo mais frequente (HBE1) foi compartilhado com o haplótipo BR36 (EF068048), o qual foi encontrado em sete das oito amostras do Brasil (PASTENE et al., 2015). Além disso, esse haplótipo também foi compartilhado com o haplótipo KF9116567 encontrado em uma amostra de baleia-de-Bryde de Aruba, o qual foi agrupado no clado *offshore* junto com as amostras das Brydes oceânicas da África do Sul e uma amostra da Ilha Madeira (LUKSENBURG et al., 2015). Esse resultado corrobora o compartilhamento de haplótipos encontrado entre as *B. brydei* de diferentes hemisférios e oceanos, mostrando uma linhagem geográfica única, provavelmente porque essas populações divergiram recentemente (KANDA et al., 2007).

Das duas espécies de mysticetos pouco amostradas, tanto *B. physalus* quanto *B. bonaerensis* apresentaram 5 haplótipos, um para cada amostra, e

uma diversidade genética nuclear intermediária ($A = 6$ e $H_o = 0,740$; $A = 6,56$ e $H_o = 0,866$, respectivamente) entre *B. borealis* e *B. brydei*. Um dos cinco haplótipos de baleia-minke-Antártica foi compartilhado com o haplótipo Bb046 (EF113754) e quatro foram compartilhados com haplótipos (AM064, AM080, AM165 e AM305) encontrados em indivíduos amostrados no Oceano Pacífico Sul e Antártica (PASTENE et al., 2007; PASTENE & GOTO, 2016). No entanto, devido à falta de informação nos trabalhos citados acima, não se sabe a localização exata das amostras que apresentaram esses haplótipos.

V.3.4 *Proporção Sexual*

A estimativa da proporção sexual em populações de mamíferos é de extrema importância para a compreensão do comportamento reprodutivo, da dinâmica populacional, incluindo a tendência à dispersão por sexo, e da densidade demográfica (BROWN et al., 1991). Embora a proporção sexual esperada seja de 1:1 (mesmo número de fêmeas e machos), em algumas populações de cetáceos essa proporção desvia da taxa esperada (CASTILHO et al., 2015, GREEN et al., 2011).

Das 271 amostras de 19 espécies de cetáceos coletadas nas Campanhas de Telemetria e de Avistagem Embarcada e MAP durante os três anos do PMC-BS (incluindo as três amostras de baleia-jubarte (**GM1 a GM3**) coletadas no norte de Santa Catarina), 264 tiveram o sexo determinado geneticamente, resultando na identificação de 149 fêmeas e 115 machos.

Após a identificação da espécie (disponível no **item IV.1.2 Identificação Molecular das Espécies**) e a identificação individual para cada amostra (disponível no **item IV.3.3. Diversidade Genética**), nove amostras (uma fêmea e oito machos) identificadas como reamostragem do mesmo indivíduo foram removidas, resultando em 148 fêmeas e 107 machos do total de 255 indivíduos sexados. A **Tabela V.3-20** apresenta o número de machos e fêmeas para cada espécie amostrada.

Tabela V.3-20: Número de machos e fêmeas identificados geneticamente para cada espécie amostrada nas campanhas de Telemetria e de Avistagem Embarcada e MAP do PMC-BS

Espécie	Macho	Fêmea	Total
<i>Tursiops truncatus</i>	19	23	42
<i>Stenella frontalis</i>	30	36	66
<i>Stenella longirostris</i>	11	35	46
<i>Stenella attenuata</i>	3	9	12
<i>Stenella clymene</i>	5	2	7
<i>Delphinus delphis</i>	3	5	8
<i>Steno bredanensis</i>	3	5	8
<i>Sotalia guianensis</i>	1	1	2
<i>Peponocephala electra</i>	1	3	4
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	1	0	1
<i>Orcinus orca</i>	1	0	1
<i>Physeter macrocephalus</i>	0	4	4
<i>Balaenoptera musculus</i>	1	1	2
<i>Balaenoptera physalus</i>	3	2	5
<i>Balaenoptera borealis</i>	8	5	13
<i>Balaenoptera brydei</i>	3	8	11
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	3	2	5
<i>Megaptera novaeangliae</i> *	10	7	17
<i>Eubalaena australis</i>	1	0	1
Total	107	148	255

* Inclui 2 amostras (1 macho e 1 fêmea) coletadas no norte de Santa Catarina

A proporção sexual foi estimada para cada espécie bem amostrada (número amostral maior que dez indivíduos) e comparada à proporção esperada de 1:1 usando um Teste Binomial Exato. A proporção sexual para *S. longirostris* foi significativamente enviesada para fêmeas (3,1:1 fêmeas para machos; $P = 0,0005$). No entanto, embora a proporção de fêmeas tenha sido maior para *S. attenuata* (3:1 fêmeas para machos), *B. brydei* (2,6:1 fêmeas para machos), *S. frontalis* e *Tursiops truncatus* (1,2:1 de fêmeas para machos), essa diferença na proporção não diferiu significativamente ($P > 0,05$) da taxa esperada de 1:1 para essas espécies. Para *M. novaeangliae* e *B. borealis*, a proporção de machos foi maior (1,4:1 e 1,6:1 de machos para fêmeas,

respectivamente), mas também não diferiu significativamente ($P > 0,05$) da taxa de 1:1 esperada. No entanto, o número amostral é ainda pequeno para as três espécies de mysticeto e para *S. attenuata*, e a expectativa é de que se consigam estimativas da proporção sexual mais acuradas ao longo dos próximos anos de coleta com a obtenção de mais amostras. Além disso, a estimativa da proporção sexual populacional poderá ser estimada se existirem amostras e dados suficientes de cada espécie em questão.

Estudos genéticos que estimaram a proporção sexual para cinco dessas sete espécies têm apresentado diferentes taxas. GREEN et al. (2011) encontraram uma razão sexual maior para fêmeas (1,4:1 fêmeas para machos) de *S. frontalis* na Ilha de Grande Bahamas. Do mesmo modo, um número ligeiramente maior de fêmeas (1,2:1 fêmeas para machos) dessa espécie foi encontrado em um estudo no oeste do Atlântico Norte e no Golfo do México (VIRICEL & ROSEL, 2014). Ambos os estudos mostraram tendência em relação às fêmeas semelhantemente ao que foi encontrado para *S. frontalis* na Bacia de Santos até o momento. No entanto, no leste do Oceano Atlântico Norte, a espécie apresentou uma razão sexual maior para machos (3,3:1 e 1.3:1 machos para fêmeas na Ilha da Madeira e no Arquipélago dos Açores, respectivamente) (QUEROUIL et al., 2010a). Nesse caso, a diferença na proporção sexual foi explicada pela tendência da amostragem, pois as fêmeas com filhotes não foram amostradas na Ilha da Madeira e, apesar de amostradas no Arquipélago dos Açores, elas eram frequentemente evitadas. Além disso, machos e fêmeas reagiram diferentemente à perturbação causada pelo processo de amostragem, sendo que as fêmeas tiveram a tendência de evitar a aproximação dos barcos (QUEROUIL et al., 2010b).

Igualmente, a razão sexual mostrou maior número de machos para *S. longirostris* (1,7:1 machos para fêmeas) no Arquipélago da Sociedade, na Polinésia Francesa; para *S. attenuata* (1,3:1 machos para fêmeas) nas ilhas do Havaí; e tanto para os adultos da população oceânica de *T. truncatus* no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (1,8:1 machos para fêmeas), quanto para a população oceânica da espécie no Arquipélago dos Açores (2,8:1 machos para fêmeas) (OREMUS et al., 2007; QUEROUIL et al., 2007;

COURBIS et al., 2014; CASTILHO et al., 2015). Tanto CASTILHO et al. (2015) quanto QUEROUIL et al. (2007) também sugeriram que uma tendência na amostragem pode explicar essa diferença já que as fêmeas com filhote evitaram se aproximar do barco. No entanto, nas campanhas do PMC-BS, as fêmeas com filhote das espécies do gênero *Stenella* e de *T. truncatus* se aproximaram da embarcação e, assim como os machos, apresentaram o comportamento de nadar na proa do barco (*bow-riding*).

Com relação à proporção sexual de *M. novaeangliae*, diferentes estudos têm encontrado uma proporção maior de machos nas áreas de reprodução e proporção maior de fêmeas ou uma taxa de 1:1 nas áreas de alimentação (OLAVARRIA et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; SCHMITT et al., 2014; CYPRIANO-SOUZA et al. 2017). Por exemplo, a razão sexual foi significativamente maior para machos nas áreas de reprodução da Colômbia (2,3:1 machos para fêmeas), do Gabão (2,1:1 machos para fêmeas) e do leste da Austrália (1,6:1 machos para fêmeas), consideradas os estoques reprodutivos G, B1 e E1, respectivamente (CARVALHO et al., 2014; SCHMITT et al., 2014; CYPRIANO-SOUZA et al., 2017). Embora a razão sexual tenha sido maior para machos (1,2:1 machos para fêmeas) na população que frequenta o litoral do Brasil, considerada estoque reprodutivo A, essa taxa não diferiu da taxa esperada de 1:1. Em geral, essa proporção maior de machos nas áreas de reprodução é devido ao custo energético da reprodução e migração, sendo que as fêmeas tendem a permanecer nas áreas de alimentação por mais tempo para acumular energia que será gasta durante a lactação e a migração. Além disso, o tempo de permanência das fêmeas na área de reprodução é mais curto que o dos machos e é temporalmente alternado devido ao curto estro e à assincronia do mesmo entre as fêmeas (CRAIG & HERMAN, 1997; CERCHIO et al., 2005).

V.3.5 Estimativa de idade de baleia-jubarte

O conhecimento da idade dos cetáceos é fundamental para a compreensão dos fatores relacionados à maturidade sexual, à frequência

reprodutiva, e consequentemente ao sucesso reprodutivo populacional, além dos fatores relacionados à sobrevivência e ao ciclo de vida das populações (HERMAN et al., 2009; DUNSHEA et al., 2011; POLANOWSKI et al., 2014; JARMAN et al., 2015). No entanto, uma das principais limitações é a dificuldade de estimar a idade dos cetáceos com precisão.

Um dos métodos desenvolvidos para estimar a idade é baseado na contagem do "Grupo de Camadas de Crescimento" (*Growth Layer Group - GLG*) da dentina do dente dos odontocetos e da estrutura de cera dentro do ouvido dos mysticetos (CHITTLEBOROUGH, 1959; HOHN et al., 1989). Porém, esse método pode ser usado somente em animais mortos ou material osteológico, sendo a estimativa de idade em animais de vida livre o maior desafio, porque eles não têm características externas que mudem com a idade.

Os avanços tecnológicos têm proporcionado o desenvolvimento de novos métodos baseados em biomarcadores químicos ou moleculares envolvidos nos processos do envelhecimento para estimar idade de animais vivos, utilizando técnicas de amostragem minimamente invasivas, como as biópsias (HERMAN et al., 2009; POLANOWSKI et al., 2014). Um desses métodos é baseado no perfil lipídico de dois ácidos graxos encontrados na camada de gordura externa de duas espécies de cetáceos (Orca, *Orcinus orca*, e baleia-jubarte, *Megaptera novaeangliae*). No entanto, esse método requer a calibração para cada população amostrada entre indivíduos com idade conhecida, pois os lipídios acumulados derivam da dieta (HERMAN et al., 2009).

Recentemente, uma técnica molecular epigenética baseada na metilação de genes específicos do DNA relacionados com a idade foi desenvolvida para estimar a idade aproximada das baleias-jubarte do leste da Austrália (POLANOWSKI et al., 2014). Neste método, foram identificados três sítios CpG de três genes (TET2_CpG+31, CDKN2A_CpG+297 e GRIA2_CpG+202) de baleia-jubarte em que os níveis de metilação da citosina têm forte relação de regressão com a idade. Enquanto os sítios CpG dos genes CDKN2A e GRIA2 se tornam hipermetilados com a idade, o sítio do TET2 se torna hipometilado. A princípio, esse método epigenético, conhecido como *Humpback Epigenetic Age Assay* (HEAA), pode ser usado para estimar a idade das baleias-jubarte de

qualquer população. Portanto, o HEAA foi testado para estimar a idade aproximada das baleias-jubarte amostradas na Bacia de Santos.

Um total de 21 amostras (incluindo as três amostras (**GM1** a **GM3**) coletadas no norte de Santa Catarina) de *M. novaeangliae* foi coletado durante os três anos do PMC-BS. Porém, três dessas amostras (G147, G157 e GM2) eram duplicadas (reamostragem do mesmo indivíduo), e a amostra G136 não teve DNA após a extração, sendo assim removidas de todas as análises genéticas. Adicionalmente, uma amostra de filhote (958/12) coletada no Banco dos Abrolhos em 2012, pelo Instituto Baleia Jubarte (IBJ), foi incluída na análise como controle de idade, totalizando 18 amostras.

O DNA das 18 amostras foi convertido com bissulfito usando o Epitect Bisulphite Conversion Kit (QIAGEN). Os fragmentos dos genes TET2 (138 pares de base), CDKN2A (125 pares de base) e GRIA2 (159 pares de base) foram amplificados usando um *primer* marcado com biotina e um *primer* padrão específico para cada gene, e o PyroMark PCR kit (Qiagen), seguindo as mesmas condições de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) descritas em POLANOWSKI et al. (2014). Os produtos de PCR foram purificados com Streptavidin Sepharose HP (GE Healthcare) e pirosequenciados em um PyroMark Q24 do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP). O programa PyroMark Q24 gerou os valores do nível (em porcentagem) de metilação dos sítios CpG de cada gene.

Para cada gene foi realizado um teste inicial com três amostras usando três volumes diferentes (5, 10 e 15 µL) de PCR para ver em qual volume o pirosequenciamento apresentava melhor qualidade. Isso possibilitou também verificar o erro na medição dos níveis de metilação dessas três amostras repetidas, que pode ser atribuído ao pirosequenciamento do PyroMark Q24. A estimativa de idade foi obtida pela regressão linear múltipla das porcentagens de metilação dos três sítios CpG dos três genes baseada na regressão das 45 baleias-jubarte do Golfo do Maine com idade conhecida (**Figura V.3-8**), conforme POLANOWSKI et al. (2014).

No teste de volume, todos os genes apresentaram o melhor resultado do

pirosequenciamento com 10 µL de PCR. Os níveis de metilação (em porcentagem) dos sítios CpG+31 e CpG+297 dos genes TET2 e CDKN2A, respectivamente, foram obtidos para cada uma das 18 amostras, incluindo a amostra de filhote (**Tabela V.3-21**). No entanto, para o gene GRIA2, o nível de metilação (em porcentagem) do sítio CpG+202 foi obtido para 14 amostras. Portanto, 14 das 18 amostras de baleias-jubartes tiveram a idade estimada (**Tabela V.3-21**).

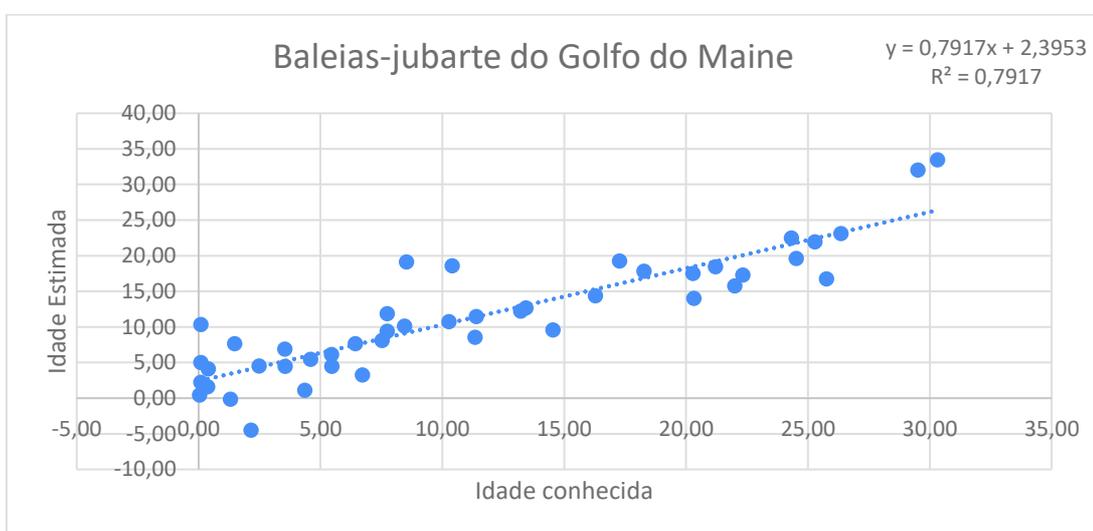


Figura V.3-8: Regressão linear múltipla das idades estimadas de 45 *Megaptera novaeangliae* baseada nas medidas de metilação dos sítios CpG e idade conhecida. Dados de Polanowski et al. (2014).

Tabela V.3-21: Estimativa de idade das amostras de *Megaptera novaeangliae* amostradas na Bacia de Santos nas campanhas do PMC-BS, baseada nos níveis (em porcentagem) de metilação dos sítios CpG de três genes: TET2, CDKN2A e GRIA2. ID = indivíduo amostrado no grupo. * Amostra 958/12 de filhote coletada pelo Instituto Baleia Jubarte. Ad = adulto; Fe = fêmea; Fi = filhote; Ep = escorte principal; Es = escorte secundário.

Amostras	Sexo	Grupo (ID amostrado)	TET2 (%)	CDKN2A (%)	GRIA2 (%)	Idade estimada
958/12*	Fêmea	FeFiEp (Fi)	24,41	4,09	2,32	13,82
G51	Macho	4 Ad	15,65	3,20	-	-
G52	Macho	4 Ad	21,38	2,68	-	-
G62	Fêmea	15 Ad	13,04	7,39	4,78	48,11

Amostras	Sexo	Grupo (ID amostrado)	TET2 (%)	CDKN2A (%)	GRIA2 (%)	Idade estimada
G78	Fêmea	1 Ad	15,98	3,32	0,81	8,23
GM1	Macho	7 Ad	0,71	2,97	2,35	25,64
GM3	Fêmea	7 Ad	24,26	2,4	0,60	-2,20
G135	Macho	2 Ad	17,17	3,27	2,01	13,79
G142	Fêmea	2 Ad	13,32	2,36	-	-
G144	Fêmea	2 Ad	18,57	4,73	3,68	27,77
G146	Macho	2 Ad	19,99	4,89	1,39	14,91
G150	Macho	FeEpEs (Ep)	12,37	4,20	4,00	31,63
G151	Macho	FeEpEs (Es)	11,67	2,69	-	-
G156	Macho	2 Ad	17,24	3,87	3,12	22,20
G183	Fêmea	FeFi (Fe)	13,59	5,48	5,61	44,69
G184	Macho	FeFiEp (Ep)	16,41	0,95	1,11	0,17
G185	Fêmea	FeFiEp (Fe)	14,09	4,00	1,79	17,57
G186	Macho	FeFiEp (Ep)	16,40	3,27	3,46	22,24

As estimativas de idade das 13 amostras do PMC-BS variaram de 0 a 48 anos e apresentaram uma idade média de aproximadamente 21 anos. As seis fêmeas tinham idade média maior (~ 23 anos) que os sete machos (~ 18 anos), sendo que a estimativa de idade da fêmea mais velha foi 48 anos e do macho foi 31 anos. Essa variação na faixa etária foi similar àquela encontrada para as baleias do leste da Austrália, que variou de 0 a 52 anos (POLANOWSKI et al., 2014). No entanto, a população da Austrália apresentou uma idade média de 10 anos, o que corrobora os dados de uma população jovem que está se recuperando de uma exploração passada, e com uma taxa de crescimento de 10% por ano (NOAD et al., 2011). Recentemente, uma taxa de crescimento de 12% por ano foi estimada para a população de baleia-jubarte do Atlântico Sudoeste, estoque reprodutivo A (WEDEKIN et al., 2017). Porém, para uma estimativa mais robusta da idade média dessa população, será necessário um tamanho amostral maior e uma amostragem com intenção de avaliar a estrutura etária.

A idade estimada de uma das fêmeas (G183) com filhote amostrada na Bacia de Santos foi de 44 anos, sendo semelhante a um estudo de mais de 30

anos das baleias do sudeste do Alasca, o qual documentou uma fêmea de 44 anos com filhote, baseado em dados de avistagem (1972-2016), e sugeriu uma idade máxima reprodutiva das fêmeas de aproximadamente 32 anos, levando em conta que a idade da primeira prenhez das fêmeas dessa população é de aproximadamente 12 anos (GABRIELE et al., 2017).

Em contrapartida, a estimativa de idade de uma fêmea (GM3) juvenil, com aproximadamente 10 metros de comprimento, amostrada na costa de Santa Catarina, foi negativa. Similarmente, um macho juvenil de dois anos e um macho de um ano (*yearling*), tiveram as estimativas de idade negativas no estudo de POLANOWSKI et al. (2014) (ver **Figura V.3-8**). Essas estimativas negativas se devem à precisão do HEAA, que apresentou um desvio padrão de 2,99 anos baseado na diferença entre as idades estimadas e conhecidas. Da mesma forma, um escote (G184) acompanhando uma fêmea com filhote teve a idade estimada de filhote, sugerindo que esse macho pode ser um *yearling*, um filhote dessa fêmea do ano anterior ou pode ser uma medida errada do pirosequenciamento.

De acordo com POLANOWSKI et al. (2014), a precisão do sistema PyroMark baseada no desvio padrão de seis medidas repetidas das mesmas quatro amostras foi de 2,20 anos, indicando uma proporção razoavelmente alta de erro de precisão atribuído à falha na medição dos níveis de metilação. As diferenças percentuais da metilação encontrada nos sítios do CDKN2A e GRIA2 são muito pequenas e isso pode contribuir na medição errada do sistema PyroMark (POLANOWSKI et al., 2014). No entanto, os resultados do pirosequenciamento repetido de três amostras, para verificar o erro na medição dos níveis de metilação, indicaram que somente o TET funcionou com diferentes volumes de PCR e apresentou medições similares do nível de metilação para cada repetição. O sítio do gene CDKN2A funcionou somente para o volume de 10 µL, não possibilitando uma comparação entre as diferentes repetições. Já o sítio do gene GRIA2 funcionou para os volumes de 10 e 15 µL somente para a amostra 958/12, sendo que no volume de 10 µL a porcentagem de metilação foi de 2,32% e no volume de 15 µL a porcentagem foi de 3,00%. Essa diferença de apenas 0,68% pode aumentar a idade em até

quase quatro anos, mostrando que a medição do nível de metilação do GRIA2 é extremamente sensível e deve ser repetida pelo menos três vezes para obter dados mais precisos.

Quanto à amostra de filhote coletada pelo IBJ e usada como controle, a idade foi superestimada em 13 anos. Essa superestimativa de idade foi também encontrada em alguns filhotes do Golfo do Maine, sendo que um deles teve sua idade estimada em 10 anos (ver **Figura V.3-8**). POLANOWSKI et al. (2014) verificaram que os indivíduos jovens tiveram suas idades superestimadas e os mais velhos levemente subestimadas. A estimativa epigenética da idade das baleias-jubarte é uma metodologia nova e ainda experimental, sendo que até o momento foram publicados somente os dados do estudo original em 2014. Portanto, para estimativas de idade mais precisas serão necessárias algumas melhorias, como fazer pelo menos duas a três repetições de cada amostra, além de incluir mais amostras controle de filhote ou indivíduos recapturados em diferentes anos (no mínimo 4 anos entre as recapturas) para verificar a precisão do pirosequenciamento do PyroMark Q24.

V.4 Padrões comportamentais

V.4.1 Comportamento de mergulho

Os dados de mergulho foram coletados utilizando o *Wildlife Computers Behavior Log*, que compila os dados de padrões de mergulho preestabelecidos na programação e os transmite via sistema de satélites Argos. Falhas podem ocorrer neste processo, sem a transmissão destas informações, decorrentes de uma cobertura reduzida de satélites, do comportamento de superfície da espécie/indivíduo, condições ambientais e ciclo de trabalho preestabelecido na programação do transmissor.

Nesse sentido, considerando a ausência de informações sobre comportamento de mergulho para a maioria das espécies, nos dois primeiros

anos, foram testados diferentes parâmetros de definição de um mergulho para as diferentes espécies. A definição de um mergulho considera o comportamento da espécie, onde é estabelecida uma profundidade mínima e uma duração mínima para que o comportamento seja considerado como um mergulho. Esses parâmetros visam reduzir vieses relacionados ao tamanho dos indivíduos e ao comportamento de superfície de muitas espécies, que podem realizar várias respirações subsequentes quando próximas à linha d'água, que não necessariamente caracterizam um mergulho. O formato dos mergulhos foi classificado automaticamente pelo Programa de Análises de Mergulho da Wildlife Computers (DAP), versão 3.0, que considera três categorias que refletem a forma do perfil de mergulho: *square* (ou “quadrado”, em português), “U” e “V”. Estas categorias, portanto, são baseadas no perfil de mergulho, que considera a proporção de tempo que o animal permanece no fundo, descida/subida mais rápida ou lenta e tempo em cada profundidade.

Os transmissores foram programados também para gerar três tipos de histogramas: o *time at depth*, que quantifica em termos percentuais o tempo que o animal permanece, ao longo do dia, num determinado intervalo de profundidade preestabelecido. O *dive maximum depth* quantifica o número de mergulhos realizados em cada intervalo de profundidade preestabelecido a cada dia, e o *dive duration* quantifica o número de mergulhos realizados em cada intervalo de tempo preestabelecido.

Golfinho-nariz-de-garrafa, Tursiops truncatus

Para o golfinho-nariz-de-garrafa, foram obtidos dados de comportamento de mergulho para sete indivíduos (n = 2.875 mergulhos), embora a maior parte dos registros tenha sido feita para o PTT 34751 (n = 2.160). Mais de 50% dos mergulhos foram em formato *square* para todos os indivíduos, seguidos dos mergulhos em formato *U*, embora o formato predominante tenha variado entre os indivíduos (**Figura V.4-1**).

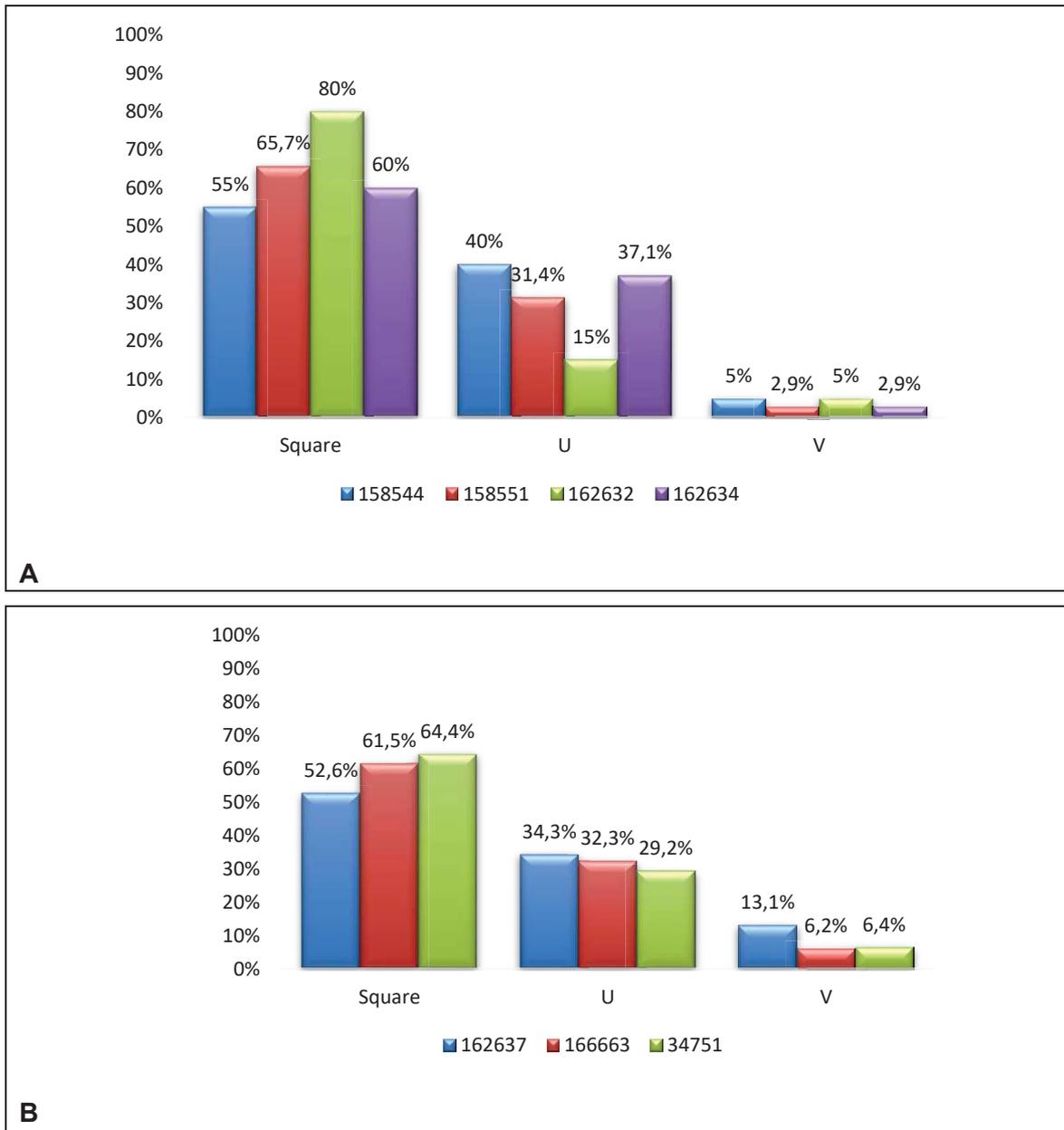


Figura V.4-1: *Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para os golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) marcados com transmissores satelitais números PTT 158544, 158551, 162632 e 162634 (A); e 162637, 166663 e 34751 (B) marcados na Bacia de Santos.*

A maior profundidade de mergulho foi registrada em 70,5 m para mergulho em *U*. Os mergulhos *square* foram os mais rasos ($F=39,306$; $df=2$; $n=2157$; $p<0,001$), enquanto os mergulhos em *U* e *V* não diferiram em relação a este

parâmetro. Não houve diferença na duração dos mergulhos ($F=4,4598$; $df=2$; $n=2.157$; $p=0,01167$), mas o mergulho mais longo foi do tipo *square*, chegando a 5min29s de duração (**Figura V.4-2 e Figura V.4-3**) (**Tabela V.4-1**).

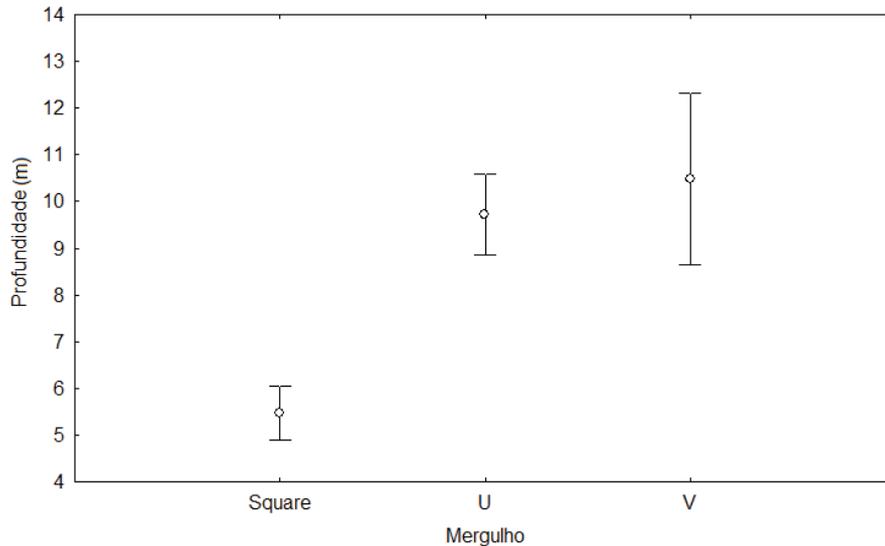


Figura V.4-2: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de golfinhos-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

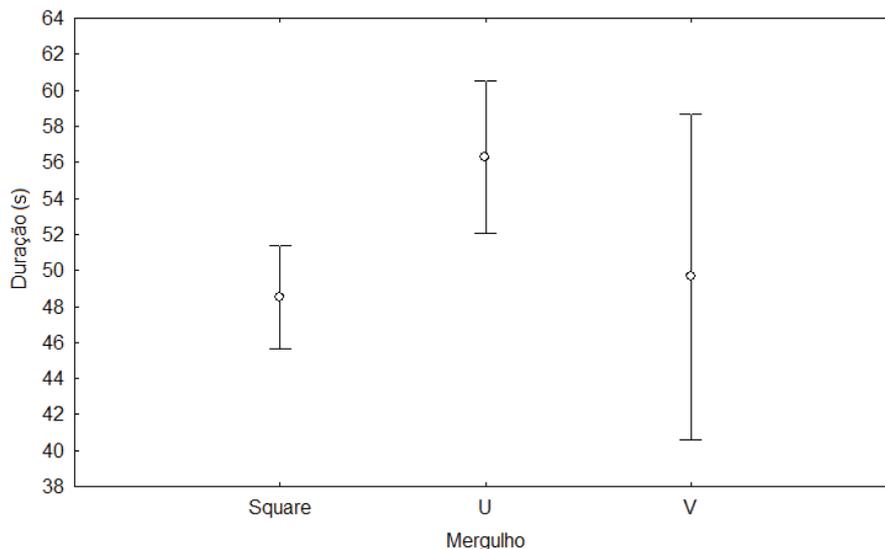


Figura V.4-3: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de golfinhos-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, marcados com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

Foram obtidos resultados de histogramas para três indivíduos (PTT 162637, PTT 166663 e PTT 34751). Os dados mostram que os indivíduos permaneceram, em média, 75,9% do dia a uma profundidade de até 10 metros. Cerca de 66% dos mergulhos ocorreram a uma profundidade de até 10 m (n = 14.239). A grande maioria dos mergulhos, 81,3%, teve duração máxima de 2 minutos (n = 17.127).

Os dois ecótipos descritos para *T. truncatus* no litoral brasileiro ocorrem na Bacia de Santos (COSTA et al., 2016) e os dados de genética e de padrão de coloração indicam que todos os animais marcados durante o PMC-BS pertencem ao chamado ecótipo oceânico. A maior parte das pesquisas é realizada com animais do ecótipo costeiro, incluindo a caracterização do comportamento de mergulho, cujo conhecimento é muito limitado. Nas Bermudas, a maior parte dos mergulhos mais profundos chegou a 250 m, mas o limite máximo excedeu 500 m de profundidade (KLATSKY et al., 2007). HASTIE et al. (2006), utilizando métodos acústicos, registraram mergulhos de até 58,5 m de profundidade, o que coincidiu com o fundo marinho numa região costeira do Atlântico Norte, na Escócia. Analisando a atividade acústica dos animais, conclui-se que a maior parte do comportamento de pesca ocorreu até uma profundidade de 10 m.

Tabela V.4-1: Duração média, profundidade média de mergulho e desvio padrão das diferentes categorias registradas para os indivíduos marcados com transmissor satelital na Bacia de Santos e número total de mergulhos registrado para cada categoria. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos de cada parâmetro. DM = duração média em segundos; PM = profundidade média em metros. PTT = código do transmissor.

Tipo de mergulho		Square			U			V			Total
Espécie	PTT	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	
<i>Tursiops truncatus</i>	15854 4	99,3 ± 59,8 (41-245)	12,2 ± 14 (3-44)	22	73,6 ± 17,9 (41-111)	6,1 ± 3,4 (3-16)	16	126 ± 43,8 (95-157)	7,2 ± 3,9 (4,5-10)	2	40
<i>Tursiops truncatus</i>	15855 1	152,1 ± 41,2 (89-237)	19,3 ± 1,2 (15,5-21)	23	107,9 ± 22,8 (75-143)	21,1 ± 4,6 (15-27)	11	101 (101-101)	16,5 (16,5-16,5)	1	35
<i>Tursiops truncatus</i>	16263 2	85,2 ± 71,6 (21-239)	9,9 ± 12,8 (3-36)	16	131 ± 89,9 (63-233)	18 ± 15,9 (3,5-35)	3	77 (77-77)	7 (7-7)	1	20
<i>Tursiops truncatus</i>	16263 4	106,6 ± 57 (21-241)	19,4 ± 20,1 (3-56,5)	42	68,9 ± 43,4 (25-189)	13,5 ± 12,6 (3-51)	26	61 ± 2,8 (59-63)	10,7 ± 0,3 (10,5-11)	2	70
<i>Tursiops truncatus</i>	16263 7	100,8 ± 72,8 (21-285)	16,3 ± 16,3 (3-66,5)	221	63,5 ± 38,4 (21-195)	11,7 ± 11,5 (3-58,5)	144	63 ± 34,2 (21-181)	13,6 ± 10,2 (3,5-46)	55	420
<i>Tursiops truncatus</i>	16666 3	98,1 ± 66,3 (21-233)	21,2 ± 24,2 (2-58,5)	80	65,5 ± 35,8 (23-171)	11,1 ± 14,6 (2-55)	42	78,5 ± 45,8 (27-163)	12,7 ± 14,9 (4-48)	8	130
<i>Tursiops truncatus</i>	34751	48,5 ± 59 (11-329)	5,5 ± 10,4 (1-68,5)	1.390	56,3 ± 46,3 (11-329)	9,3 ± 11,9 (1,5-70,5)	631	49,7 ± 36,6 (11-157)	10,5 ± 12,5 (2-56,5)	139	2.160

Tipo de mergulho		Square			U			V			Total
Espécie	PTT	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	
<i>Megaptera novaeangliae</i>	15854 2	124 ± 80,7 (31-605)	13,4 ± 3,7 (5-23,5)	1.109	96,1 ± 99,8 (31-715)	9,7 ± 4 (5-21,5)	423	143,3 ± 140 (31-751)	10,7 ± 5 (5-21)	98	1.630
<i>Megaptera novaeangliae</i>	15855 3	321,3 ± 244,5 (31-1.607)	59,3 ± 52,4 (10-217,5)	270	157,3 ± 180,8 (31-779)	47,9 ± 60 (10-299,5)	491	172,8 ± 224,2 (33-959)	26 ± 19 (10-74,5)	24	785
<i>Megaptera novaeangliae</i>	34588	239,7 ± 173,4 (31-873)	31,8 ± 31,6 (5-231)	1.496	120,6 ± 127,3 (31-759)	24,6 ± 28,2 (5-229,5)	2.317	143,3 ± 135,1 (31-677)	26,8 ± 27 (5-145,5)	272	4.085
<i>Megaptera novaeangliae</i>	34686	253,5 ± 210,4 (31-1.045)	22,8 ± 16,6 (5-106,4)	1.069	138,8 ± 121 (31-845)	26,3 ± 22,5 (5-137,5)	582	184 ± 160,2 (31-737)	27,4 ± 15,9 (7,5-70,5)	63	1.714
<i>Orcinus orca</i>	15854 7	149,1 ± 156,9 (21-625)	31 ± 62 (3-299)	112	94,2 ± 124,5 (21-683)	17,6 ± 50,7 (3-347)	109	215 ± 82,5 (125-287)	33,3 ± 21,7 (13,5-56,5)	3	224
<i>Orcinus orca</i>	16262 8	266,2 ± 278 (35-943)	35,7 ± 56,5 (10-98,5)	710	233,9 ± 133,4 (33-703)	60,7 ± 72,3 (10-307,5)	274	224,3 ± 119,1 (47-583)	46,2 ± 3,6 (10-403,5)	53	1.037
<i>Orcinus orca</i>	16263 3	277 ± 89 (21-767)	29,9 ± 16,2 (5-102,5)	2.348	152,9 ± 101,4 (21-571)	17,1 ± 15,4 (5-98,5)	476	17,5 ± 102,7 (5,5-80,5)	145,1 ± 16,7 (21-431)	96	2.920

Tipo de mergulho		Square			U			V			Total
Espécie	PTT	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	
<i>Balaenoptera borealis</i>	158546	179,4 ± 109,1 (37-551)	12,4 ± 2,4 (10-21)	48	47 ± 70,1 (34-115)	13,6 ± 3,9 (10-26)	34	124,9 ± 89 (31-315)	14,3 ± 4,9 (10-33)	47	129
<i>Balaenoptera borealis</i>	162629	355,3 ± 278 (53-953)	11,1 ± 1,6 (10-15)	13	350,8 ± 279,7 (53-839)	12,9 ± 3,6 (10-22)	12	402,5 ± 277,7 (87-893)	14,9 ± 6 (10-32)	20	45
<i>Balaenoptera borealis</i>	162630	262,6 ± 194,1 (41-943)	11,9 ± 1,84 (10-19,5)	256	119 ± 104,1 (31-717)	14,8 ± 6,8 (10-74,5)	219	212,7 ± 143,7 (33-863)	17,8 ± 9,6 (10-94,5)	234	709
<i>Peponocephala electra</i>	34773	119,7 ± 20,1 (101-141)	7,2 ± 2 (5-9)	3	119 ± 2,8 (117-121)	8,7 ± 0,3 (8,5-9)	2	0	0	0	5
<i>Physeter macrocephalus</i>	34732	1.611,2 ± 1.322,8 (31-3.951)	343,2 ± 365 (5-1.159,5)	311	756 ± 956,6 (37-3.471)	172,8 ± 316 (5-1.255,1)	382	717,9 ± 730,4 (31-3.517)	124,5 ± 306,5 (7-1.447,5)	87	780
<i>Physeter macrocephalus</i>	34746	156 ± 128,7 (65-247)	13,5 ± 10,6 (6-21)	2	208,3 ± 201,3 (79-451)	30 ± 40,3 (5,5-76,5)	3	0	0	0	5

Tipo de mergulho		Square			U			V			Total
Espécie	PTT	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	DM (s)	PM (m)	Total	
<i>Physeter macrocephalus</i>	34792	1.093,7 ± 1.649,4 (47-2.995)	328,8 ± 560 (5-975,5)	3	701,7 ± 1.201,4 (35-3.135)	237,6 ± 469,8 (5-1.191,5)	6	0	0	1	10
<i>Balaenoptera brydei</i>	166662	234,4 ± 137,9 (35-789)	16,5 ± 24,2 (5-42)	90	181,3 ± 175,5 (33-1.141)	15,1 ± 11,9 (5-33)	71	289,7 ± 305,3 (41-1.491)	27,6 ± 15,3 (5-82,5)	33	194
<i>Balaenoptera brydei</i>	34775	138,4 ± 65,4 (63-239)	7,5 ± 2,6 (5-12)	10	92,2 ± 54,2 (37-241)	21,7 ± 9,5 (6,5-30)	12	123,7 ± 44,1 (75-161)	31,7 ± 4 (28-36)	3	25
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	166666	312,5 ± 251,9 (31-1.049)	8,8 ± 5,6 (5-54)	179	238,6 ± 243,6 (31-945)	28,1 ± 43,6 (5-181,5)	79	351,3 ± 297,8 (31-1.161)	19,4 ± 16,5 (5-84,5)	87	345
<i>Balaenoptera physalus</i>	158549	638,6 ± 238,9 (171-877)	12,7 ± 2,8 (10-20,5)	11	291 ± 270,7 (47-569)	52,9 ± 48,3 (12-50)	4	459,8 ± 387,3 (33-823)	45,3 ± 25,1 (17-72,5)	5	20

Baleia-jubarte, Megaptera novaeangliae

Foram obtidos dados de mergulho com qualidade para quatro *Megaptera novaeangliae*. O comportamento de mergulho foi distinto para os indivíduos que migraram para o sul (PTT 158553 e PTT34588), com predominância de mergulhos do tipo *U*, que foram também os mais profundos, embora os mais longos tenham sido os *square*. Para os indivíduos que permaneceram junto à costa (PTT 158542 e PTT 34686) predominou o tipo *square* (**Figura V.4-4**).

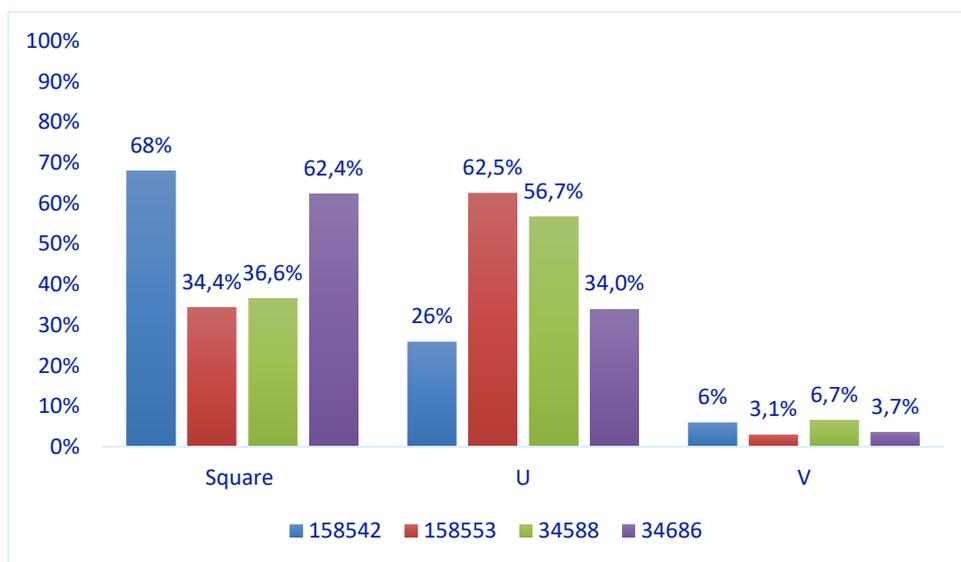


Figura V.4-4: *Frequência dos comportamentos de mergulhos registrados em baleias-jubarte (Megaptera novaeangliae), marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.*

Para os indivíduos que permaneceram próximo à costa, não houve diferença na profundidade dos mergulhos ($F=3,2292$; $df=2$; $n=3.341$; $p=0,03971$), mas o mergulho mais profundo foi do tipo *U*, chegando a 299,5 metros de profundidade. Os mergulhos *U* tiveram menor duração que os demais ($F=47,262$; $df=2$; $n=3.341$; $p<0,001$) e o mergulho mais longo registrado foi um *square*, chegando a 26min47seg (**Tabela V.4-1**; **Figura V.4-5** e **Figura V.4-6**).

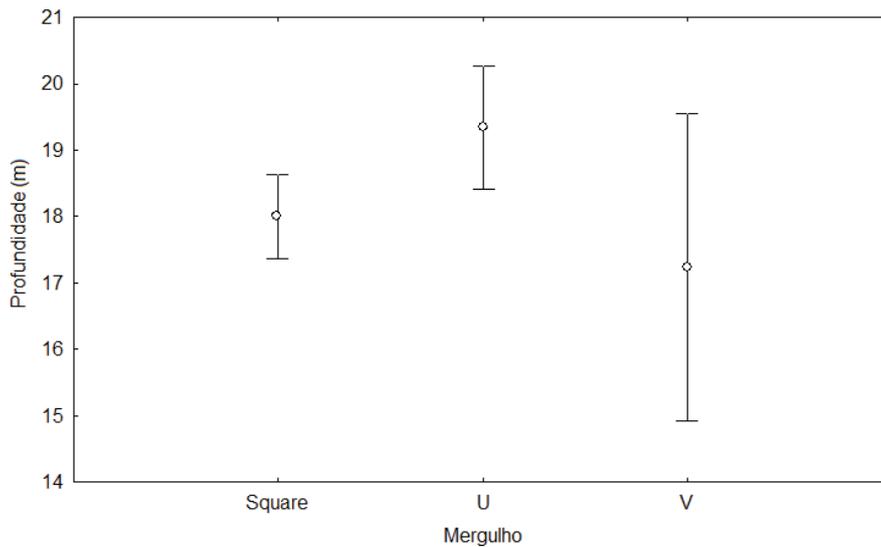


Figura V.4-5: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, *Megaptera novaeangliae*, marcadas com transmissores satelitais na região costeira da Bacia de Santos.

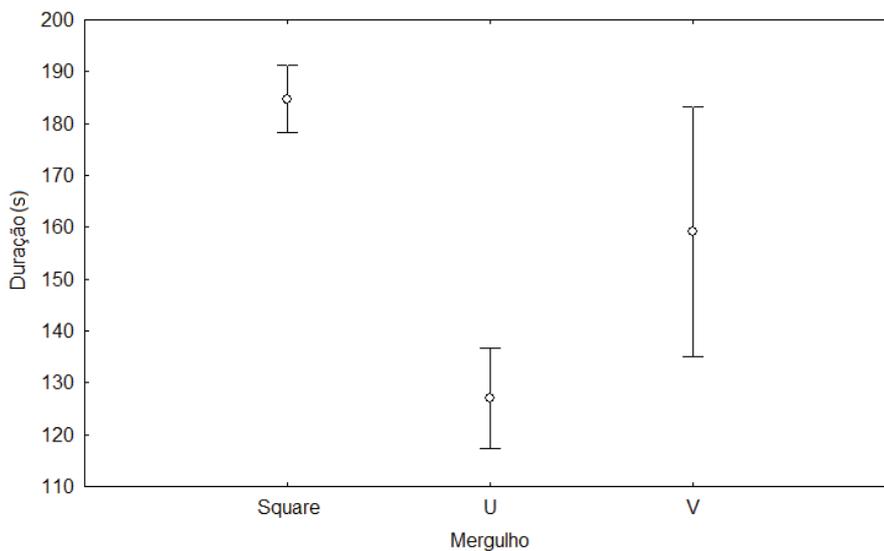


Figura V.4-6: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, *Megaptera novaeangliae*, marcadas com transmissores satelitais na região costeira da Bacia de Santos.

Na região oceânica, foi detectada uma diferença significativa tanto na profundidade ($F=22,182$; $df=2$; $n=4.837$; $p<0,001$) como na duração ($F=341,64$; $df=2$; $n=4.837$; $p<0,001$) dos mergulhos, sendo o tipo *square* mais longo e mais profundo (**Figura V.4-7** e **Figura V.4-8**).

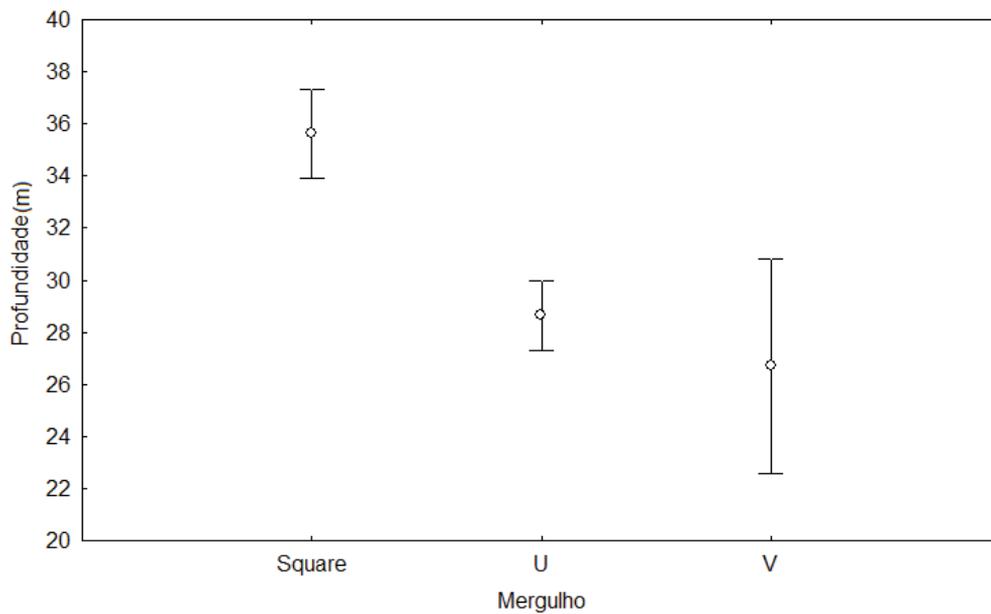


Figura V.4-7: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, *Megaptera novaeangliae*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

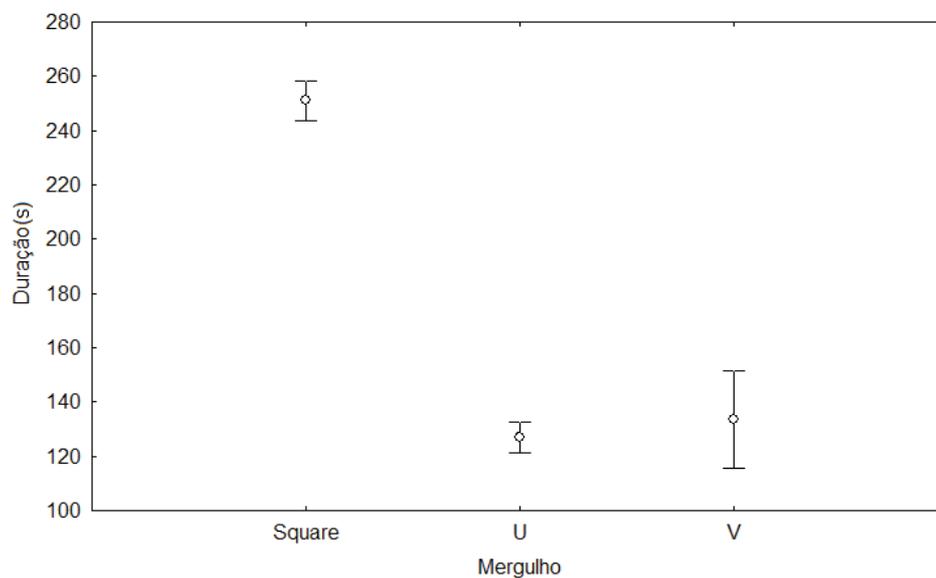


Figura V.4-8: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-jubarte, *Megaptera novaeangliae*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

Os resultados dos histogramas mostram que os indivíduos em rota migratória (PTT 158553 e PTT 34588) permaneceram, em média, 47,1% e 61,1% do dia, respectivamente, a uma profundidade de até 20 metros, enquanto os animais que permaneceram na costa (PTT 158542 e PTT 34686) estiveram em média 54,4% do dia nessa faixa de profundidade. A maior parte dos mergulhos (46%, 61,9%, 98,9% e 66,7%, respectivamente) ocorreu até uma profundidade de 20 m, sendo que, para um dos indivíduos, 20,6% dos mergulhos ocorreram entre 75 e 150 metros de profundidade (20,6%) (n = 28.975). A grande maioria dos mergulhos teve duração de até 5 minutos (78,4%, 85,4%, 93,5% e 82,2%, respectivamente) (n = 28.872).

Embora a espécie seja uma das espécies de mysticeto mais bem estudada, são escassas as informações sobre o comportamento de mergulho, principalmente fora das áreas de alimentação. De maneira geral, a espécie é conhecida por realizar mergulhos rasos, permanecendo a maior parte do tempo próximo da superfície (BAIRD et al., 2000). BAIRD et al. (2000) também documentaram com regularidade mergulhos profundos, de até 176 m, em área de reprodução, limitados em geral pela profundidade local.

O comportamento de mergulho durante a migração mostrou um padrão distinto em relação aos animais que permaneceram próximo da costa. Estas variações podem estar relacionadas também às diferenças de profundidade entre os ambientes ocupados, mas provavelmente estejam relacionados ao comportamento dos animais em cada situação (deslocamento de migração versus alimentação). Os animais monitorados na costa de Santa Catarina seguiram a tendência indicada por BAIRD et al. (2000), de usar toda a coluna de água. As observações de campo indicam que esse animal estava se alimentado no fundo.

Orca, Orcinus orca

Foram obtidas informações de mergulho para três *Orcinus orca*, todos machos (n = 4.181). Os mergulhos *squares* predominaram nos três indivíduos (**Figura V.4-9**) e foram os mais longos, chegando ao máximo de 15min43seg. O mergulho mais profundo foi do tipo V, chegando ao máximo de 431 metros de profundidade.

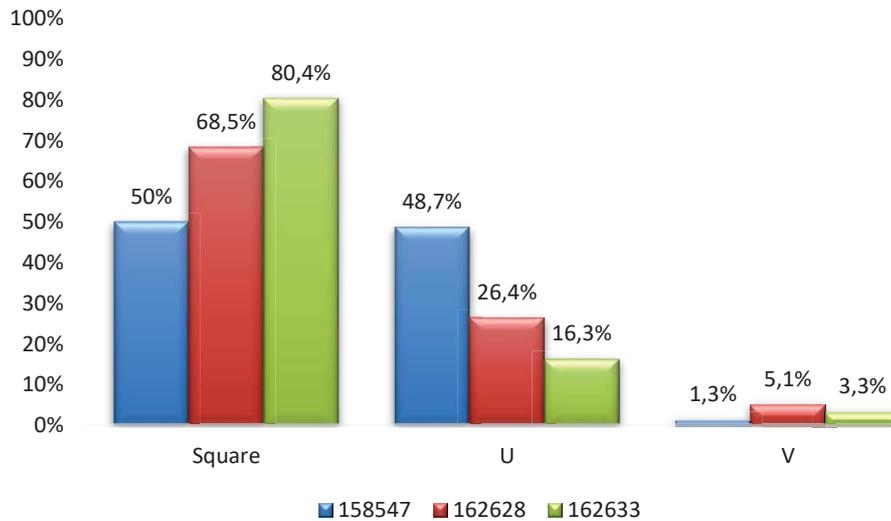


Figura V.4-9: *Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as orcas (*Orcinus orca*) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.*

Para o indivíduo marcado na costa, os mergulhos *squares* foram os mais profundos ($F=143,62$; $df=2$; $n=2.917$; $p<0,001$) e mais longos ($F=431,85$; $df=2$; $n=2.917$; $p<0,001$) (**Figura V.4-10 e Figura V.4-11**).

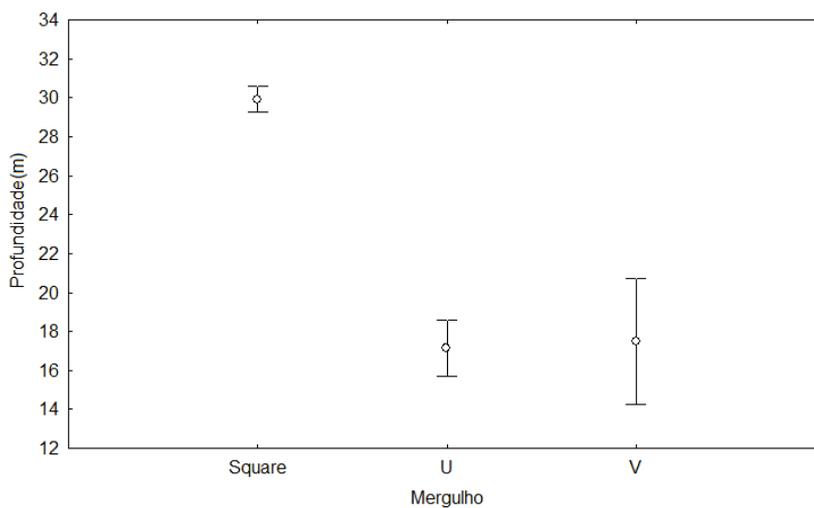


Figura V.4-10: *A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de orca, *Orcinus orca*, marcada com transmissor satelital na região costeira da Bacia de Santos.*

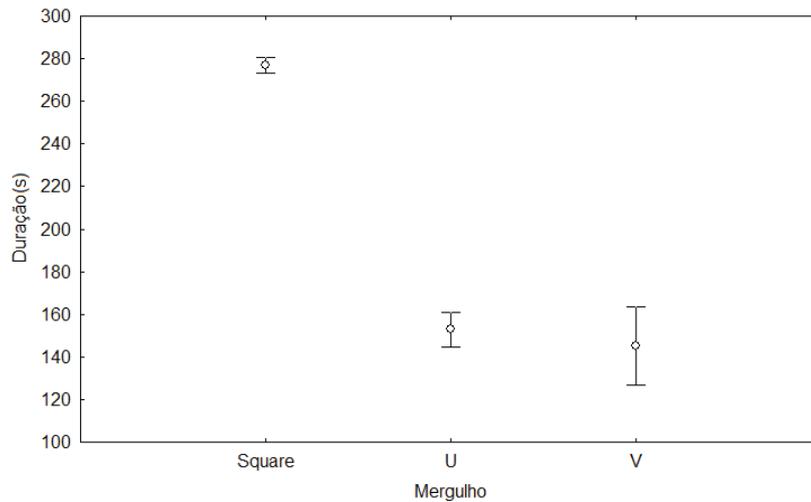


Figura V.4-11: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de orca, *Orcinus orca*, marcada com transmissor satelital na região costeira da Bacia de Santos.

Para os indivíduos marcados na região oceânica, os mergulhos *squares* foram os menos profundos ($F=6,5142$; $df=2$; $n=1.258$; $p=0,00153$) e mais longos ($F=24,595$; $df=2$; $n=1.258$; $p<0,001$) (**Figura V.4-12** e **Figura V.4-13**).

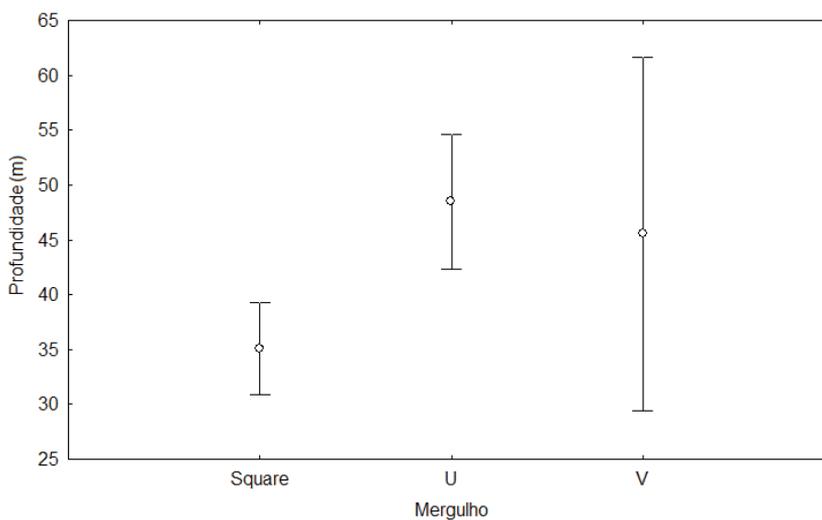


Figura V.4-12: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de orcas, *Orcinus orca*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

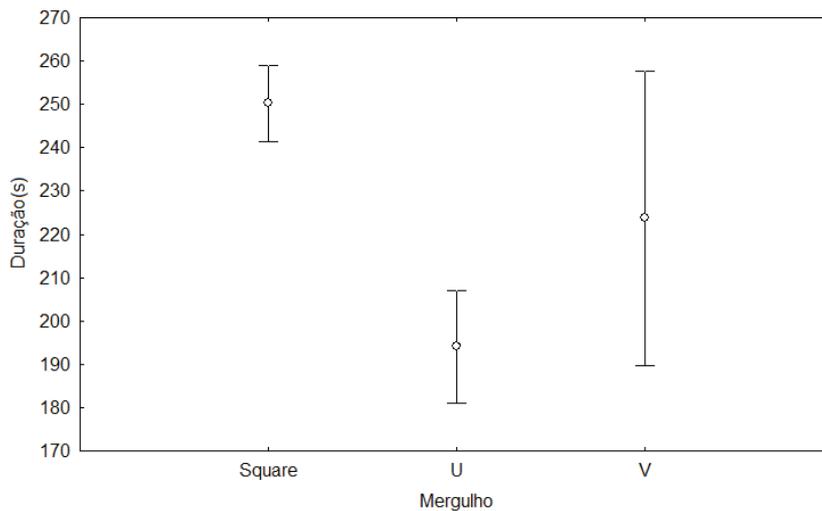


Figura V.4-13: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de orcas, *Orcinus orca*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

As informações de histograma foram obtidas de apenas dois indivíduos (PTT 162628 e PTT 162633). A maior parte dos mergulhos (80,8% e 78,7%, respectivamente) ocorreu até uma profundidade de 40 m, sendo que, para um dos indivíduos, houve uma quantidade significativa de mergulhos entre 150 e 300 metros de profundidade (12,2%) (n = 8.410). A grande maioria dos mergulhos teve duração de até 7 minutos (93,5% a 96,8%, respectivamente) (n = 8.207). Em média, os indivíduos permaneceram 80,3% e 60,2% do dia a uma profundidade de até 20 metros, respectivamente.

Não há registros do comportamento de mergulho de *Orcinus orca* no Atlântico Sul, com a maior parte das informações restritas ao Hemisfério Norte. MILLER et al. (2010), utilizando DTAGs no Alasca, concluíram que à noite ocorre uma redução no número de mergulhos e um aumento na duração dos mergulhos rasos. No presente trabalho, foram obtidos dados de um único indivíduo na região costeira e não foram verificadas diferenças na profundidade de mergulho entre o dia e a noite. Utilizando sistemas acústicos, NEWMAN & SPRINGER (2008) concluíram que os animais aumentam a atividade durante a noite, o que poderia estar associado à maior disponibilidade de suas presas. WRIGHT et al. (2017),

também no Atlântico Norte, utilizaram DTAGs e concluíram que os mergulhos de caça ocorreram a mais de 100 m de profundidade. Esses mergulhos foram classificados, em sua maioria, como mergulhos em formato V. No presente trabalho, os mergulhos *square* foram os mais rasos e mais longos. Para o indivíduo que permaneceu na região costeira, os mergulhos *square* foram os mais profundos e mais longos.

Em geral, a espécie realiza mergulhos a menos de 300 metros de profundidade, com duração de até 4 minutos (WRIGHT et al., 2017), mas tem capacidade de permanecer até 16 minutos e atingir profundidade de 767 metros (REISINGER et al., 2015). Na região das ilhas Geórgia do Sul, 76% dos mergulhos de forrageamento foram a menos de 100 metros de profundidade e 17% a mais de 200 metros (TOWERS et al., 2018).

Baleia-sei, Balaenoptera borealis

Foram obtidos dados de mergulho para três indivíduos de *Balaenoptera borealis*. Contudo, dois indivíduos tiveram um tempo reduzido de amostragem, sendo que a maior parte dos dados representa o comportamento de mergulho do indivíduo PTT 162630 (n = 256). De maneira geral, os dados indicam um equilíbrio entre os três tipos de mergulho. Embora haja uma diferença significativa no tempo de monitoramento dos indivíduos, os dados mostram um padrão semelhante entre eles, todos registrados na região oceânica.

A frequência dos diferentes tipos de mergulho variou pouco entre os indivíduos (**Figura V.4-14**).

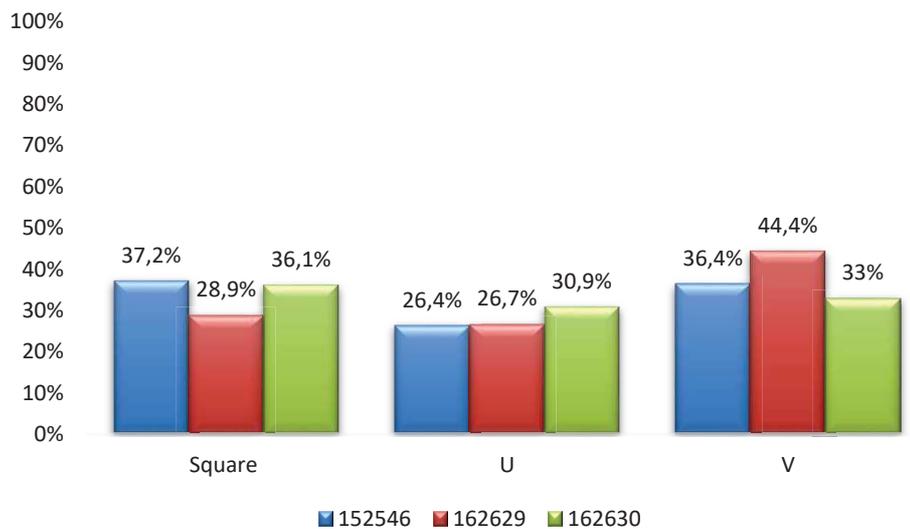


Figura V.4-14: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as baleias-sei (*Balaenoptera borealis*) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.

Os mergulhos *squares* foram os mais rasos e mais longos ($F=43,359$; $df=2$; $n=880$; $p<0,001$), enquanto os mergulhos *V* foram os mais profundos ($F=49,379$; $df=2$; $n=880$; $p<0,001$) (**Figura V.4-15** e **Figura V.4-16**). O mergulho mais longo registrado foi do tipo *square*, de 15min53seg, e o mais profundo foi do tipo *square*, que chegou a 94,5 metros de profundidade.

As informações de histograma foram analisadas apenas para o indivíduo (PTT 162630). Cerca de 78% dos mergulhos foram realizados entre 10 e 20 metros de profundidade ($n = 661$). Cerca de 75% dos mergulhos tiveram uma duração de 1 a 7 minutos ($n = 690$). Em média, o animal permaneceu cerca de 84% do dia a uma profundidade de até 10 metros.

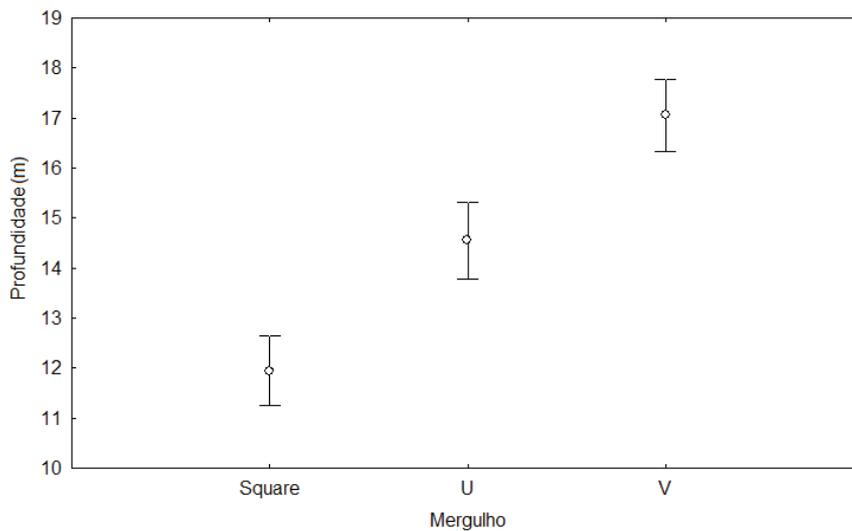


Figura V.4-15: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-sei, *Balaenoptera borealis*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

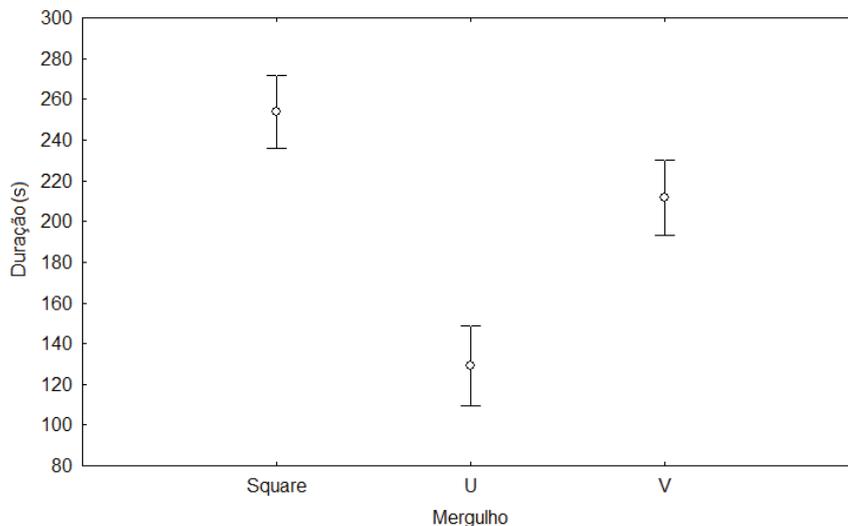


Figura V.4-16: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-sei, *Balaenoptera borealis*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

Não há registros na literatura sobre o comportamento de mergulho da espécie, o que não permite fazer comparações. A espécie é conhecida por se alimentar de copépodes, em regiões de grande produtividade (JEFFERSON et al.,

2009; OLSEN et al., 2009). Portanto, é provável que, durante sua migração entre áreas reprodutivas, em latitudes menores, e áreas de alimentação, em latitudes maiores, a espécie não se alimente. Assim, é possível que os mergulhos registrados para a espécie, todos na região oceânica durante a migração, estejam relacionados exclusivamente ao deslocamento, o que, em geral, é feito próximo da superfície (JEFFERSON et al., 2009).

Golfinho-cabeça-de-melão, Peponocephala electra

Com relação ao comportamento de mergulho de *Peponocephala electra*, foram registrados apenas cinco mergulhos de um indivíduo (PTT 34773), sendo três do tipo *square* e dois do tipo *U*. A profundidade máxima registrada foi de 9 metros e duração de 2min21seg. Dados de histograma foram limitados, mas permitiram a obtenção de informações para dois dias de amostragem. Cerca de 83% dos mergulhos foram realizados até uma profundidade máxima de 20 m e 10,5% dos mergulhos ocorreram entre 150 e 300 metros de profundidade (n = 372). Em média, o animal permaneceu cerca de 87% do dia a uma profundidade de até 20 metros. Foram registrados dois mergulhos na faixa de 400 a 500 metros de profundidade.

São escassas as informações sobre o comportamento de mergulho da espécie. Esta é o segundo estudo em que dados de mergulho foram obtidos para a espécie no mundo. WEST et al. (2018) registraram variações importantes na profundidade de mergulho entre o dia e a noite, associadas ao comportamento de forrageio da espécie sobre presas mesopelágicas que realizam migração vertical à noite. Três indivíduos foram marcados com transmissores na configuração LIMPET. Durante o dia, os animais permaneceram entre 33 e 34,5 metros de profundidade, enquanto à noite, a profundidade média dos mergulhos foi de 219,5 a 247,5 metros.

Cachalote, Physeter macrocephalus

Dados de comportamento de mergulho foram obtidos para três *Physeter macrocephalus*, totalizando 795 mergulhos analisados. Contudo, dois indivíduos tiveram um tempo reduzido de amostragem, sendo que a maior parte dos dados

representa o comportamento de mergulho do indivíduo PTT 34732 (n = 780). De maneira geral, os dados indicam uma predominância de mergulhos do tipo *U* (Figura V.4-17).

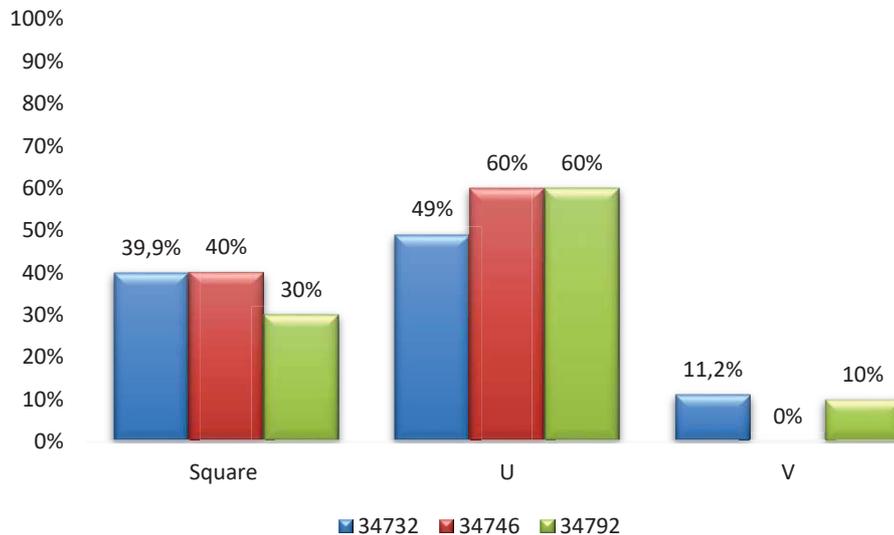


Figura V.4-17: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para os cachalotes (*Physeter macrocephalus*) marcados com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.

Em média, os mergulhos *squares* foram os mais longos (F=57,513; df=2; n=792; p<0,001) e os mais profundos (F=27,307; df=2; n=792; p<0,001) (Figura V.4-18 e Figura V.4-19). O mergulho mais profundo registrado foi em V, chegando a 1.447,5 m e o mais longo foi um *square*, chegando a 1h5min51seg.

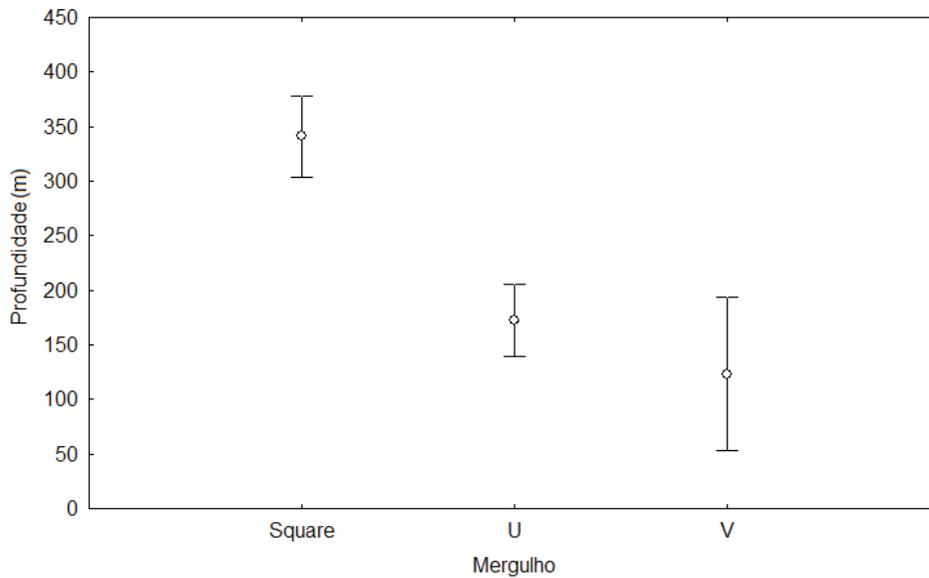


Figura V.4-18: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de cachalotes, *Physeter macrocephalus*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

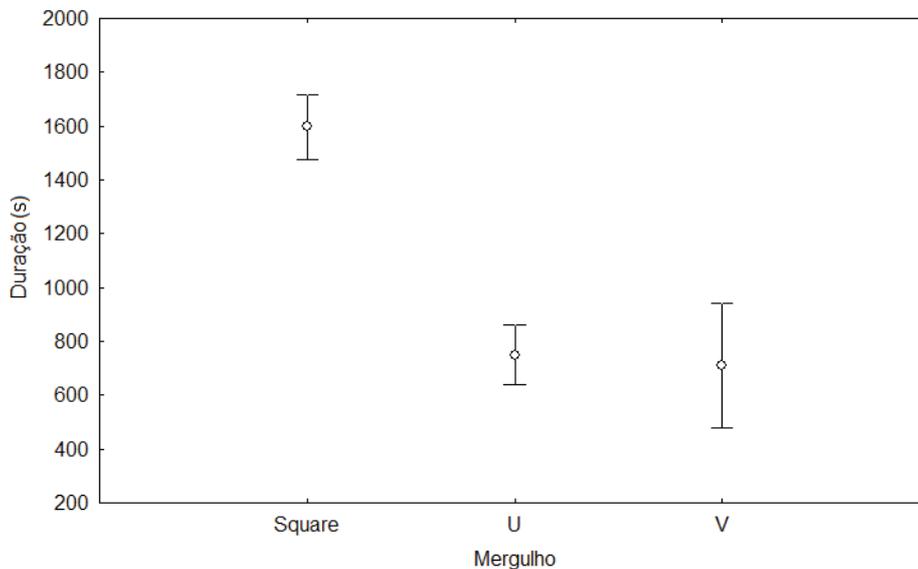


Figura V.4-19: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de cachalotes, *Physeter macrocephalus*, marcadas com transmissores satelitais na região oceânica da Bacia de Santos.

As informações de histograma foram obtidas apenas para um indivíduo (PTT 34732). Cerca de 29% dos mergulhos foram realizados até uma profundidade

máxima de 100 m e 29% dos mergulhos foram a mais de 500 metros de profundidade (n = 757). Cerca de 59% dos mergulhos tiveram uma duração de até 10 minutos, e 26% tiveram 50 a 70 minutos de duração (n = 757). Em média, o animal permaneceu cerca de 47% do dia a uma profundidade de até 100 metros e 38% do dia a mais de 500 metros de profundidade.

Physeter macrocephalus são conhecidos por sua grande capacidade de mergulho, que regularmente pode chegar a 60 min e mais de 1.000 metros de profundidade (AOKI et al., 2007). Mergulhos que chegam a 350 metros de profundidade podem ser considerados rasos para a espécie e estão relacionados a comportamentos de socialização e descanso, enquanto os mergulhos de forrageamento ocorrem em grandes profundidades (MILLER et al., 2004; AOKI et al., 2012). No Golfo da Califórnia, IRVINE et al. (2017) registraram uma profundidade média máxima de mergulho em 325 metros (DP = 239), com mergulhos ocasionais a 1.500 metros de profundidade. A duração média dos mergulhos foi de 25,4 minutos (DP = 14,2 min). Na região das ilhas Geórgia do Sul a profundidade máxima de mergulhos de forrageamento do cachalote foi de 1.343 metros, e a duração máxima de 42,1 minutos (TOWERS et al., 2018), excedendo estes valores quando estão predando peixes na pesca de espinhel.

O ciclo de mergulho é bastante estereotipado para algumas regiões. Os mergulhos típicos tendem a ser de 45 minutos (variando de 14 a 64 minutos), com um tempo de permanência no fundo de 28 minutos, seguido de um intervalo na superfície de cerca de 9 minutos entre sucessivos mergulhos (WATWOOD et al., 2006). No Golfo da Califórnia, México, a espécie permanece 75% do tempo em profundidades de 200 a 400 metros (DAVIS et al., 2007).

Baleia-de-Bryde, Balaenoptera brydei

Duas *Balaenoptera brydei* forneceram dados sobre o comportamento de mergulho da espécie, sendo uma de sexo desconhecido e uma fêmea (194 e 25 mergulhos, respectivamente). A frequência entre mergulhos *squares* e *U* variou entre os indivíduos, mantendo-se, contudo, em proporção semelhante (**Figura V.4-20**). Os mergulhos em *V* foram os mais profundos (F=14,284; df=2; n=216;

$p < 0,001$). Não houve diferença significativa na duração dos mergulhos ($F=4,8467$; $df=2$; $n=216$; $p=0,00873$) (**Figura V.4-21** e **Figura V.4-22**). O mergulho mais longo registrado foi do tipo *U*, com 19min1seg, e o mais profundo foi do tipo *V*, que chegou a 82,5 metros de profundidade.

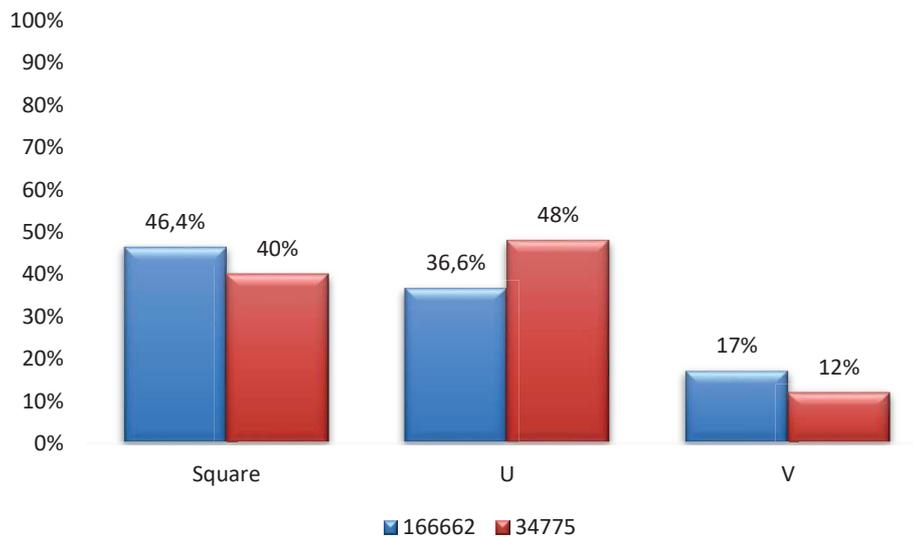


Figura V.4-20: *Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para as baleias-de-Bryde (Balaenoptera brydei) marcadas com transmissores satelitais (códigos PTT indicados no gráfico) na Bacia de Santos.*

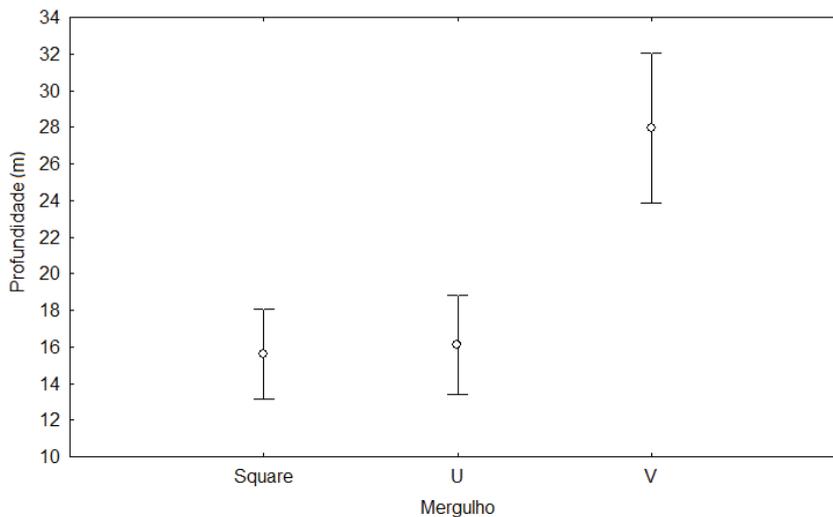


Figura V.4-21: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho de baleias-de-Bryde, *Balaenoptera brydei*, marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

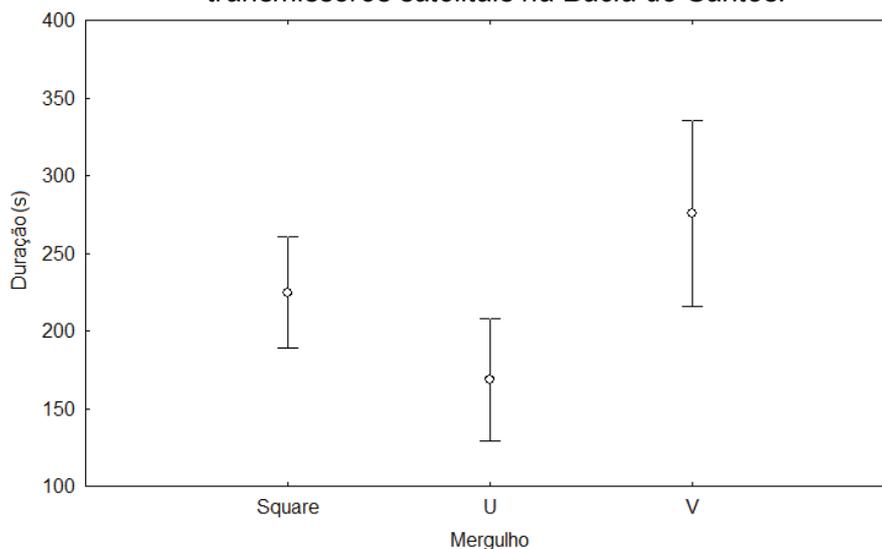


Figura V.4-22: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho de baleias-de-Bryde, *Balaenoptera brydei*, marcadas com transmissores satelitais na Bacia de Santos.

As informações de histograma foram obtidas apenas para um indivíduo (PTT 166662). Cerca de 81% dos mergulhos foram realizados até uma profundidade máxima de 50 m ($n = 322$) e 87% dos mergulhos tiveram uma duração que variou de 10 a 50 minutos de submersão ($n = 494$). Em média, o animal permaneceu cerca de 81% do dia a uma profundidade de até 50 metros.

O comportamento de mergulho de *Balaenoptera brydei* já foi documentado em diferentes regiões utilizando *tags* fixados por copos de sucção, sendo este o primeiro registro obtido por meio de telemetria satelital. SOLDEVILLA et al. (2017) registraram um padrão estereotipado a partir dos dados de um indivíduo, com mergulhos mais profundos (>70 m) durante o dia e mergulhos rasos (<30 m) à noite, similar ao registrado por ALVES et al. (2010) nas Ilhas Madeira, no Atlântico Norte.

A profundidade máxima de mergulho chegou a 271 m no Golfo do México, mas em 70% do tempo a baleia permaneceu a menos de 15 m. A baleia marcada na Bacia de Santos permaneceu 63% do tempo a uma profundidade inferior a 15 m, sendo que a profundidade máxima de mergulho registrada foi de 82,5 m.

Baleia-minke-Antártica, Balaenoptera bonaerensis

Foi marcado um macho de *Balaenoptera bonaerensis* que gerou dados sobre o comportamento de mergulho da espécie (PTT 166666). O movimento do indivíduo indica que ele estava em rota migratória para a região Nordeste do Brasil. Foram registrados 345 mergulhos, sendo que a maior parte foi do tipo *square* (51,9%), o que indica um maior tempo de fundo durante o mergulho (**Figura V.4-23**).

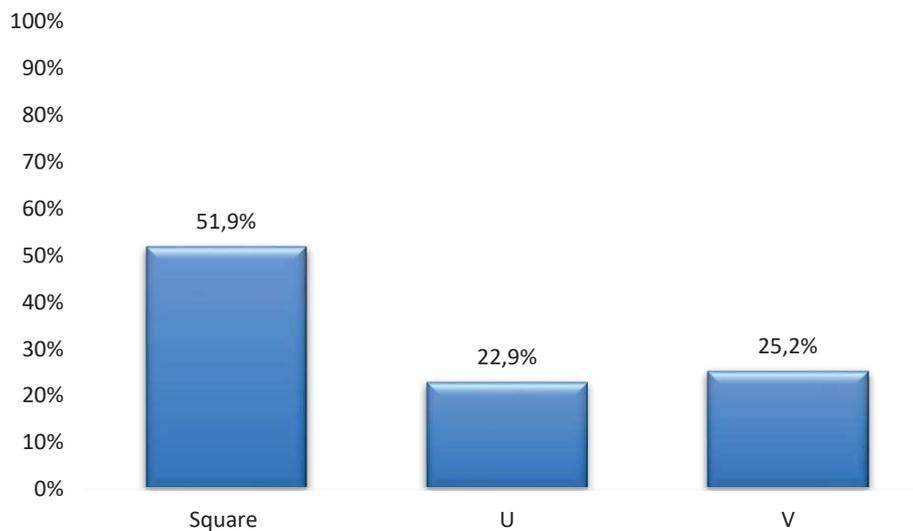


Figura V.4-23: Frequência das diferentes categorias de mergulho registradas para a baleia-minke-Antártica (*Balaenoptera bonaerensis*) marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.

Os mergulhos em *U* foram em média mais profundos ($F=21,030$; $df=2$; $n=342$; $p<0,001$), mas não houve diferença na duração entre os mergulhos ($F=3,9539$; $df=2$; $n=342$; $p=,02006$) (**Figura V.4-24** e **Figura V.4-25**). O mergulho mais longo registrado foi de 19min21seg e o mais profundo chegou a 181,5 metros de profundidade.

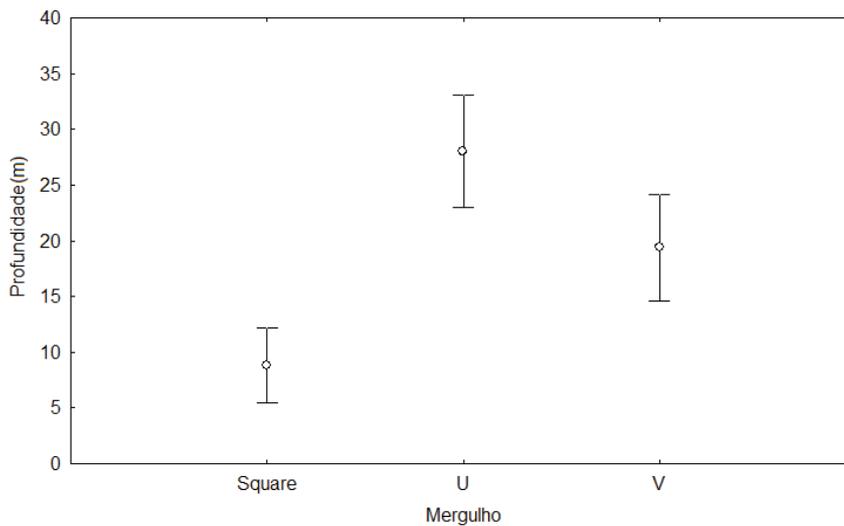


Figura V.4-24: A) Média e desvio padrão da profundidade dos diferentes tipos de mergulho da baleia-minke-Antártica, *Balaenoptera bonaerensis*, marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.

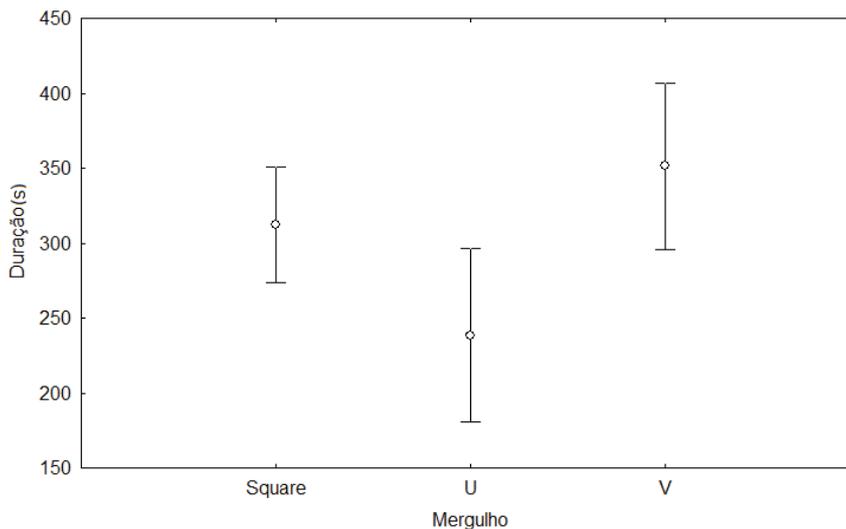


Figura V.4-25: A) Média e desvio padrão da duração dos diferentes tipos de mergulho da baleia-minke-Antártica, *Balaenoptera bonaerensis*, marcada com transmissor satelital na Bacia de Santos.

Mais de 90% dos mergulhos foram realizados até uma profundidade máxima de 30 m ($n = 322$), e 88% dos mergulhos tiveram uma duração que variou de 1 a 15 minutos de submersão ($n = 494$). Em média, o animal permaneceu mais de 70% do dia a uma profundidade de até 15 metros.

São escassas as informações sobre o comportamento de mergulho desta espécie (GALES et al., 2005). FRIEDLAENDER et al. (2014) estudaram na região da Antártica e registraram uma profundidade média de 18,5 metros e duração média de 1,4 minutos para baleias em comportamento de alimentação, com o registro de profundidade máxima em 105 metros e duração máxima de 7,2 minutos. De maneira geral, os animais tendem a permanecer mais próximos da superfície nas áreas reprodutivas, o que pode estar associado também à presença de um filhote no grupo em que este macho foi marcado.

V.4.2 Perfil de mergulho e comportamento acústico com DTAGs

Durante as seis primeiras campanhas de telemetria do PMC-BS, foi possível colocar os tags acústicos digitais (DTAGs) (JOHNSON & TYACK, 2003), em múltiplos balaenopterídeos (*Balaenoptera brydei*, *Balaenoptera borealis*, *Balaenoptera physalus*, e *Megaptera novaeangliae*), um Balaenídeo (*Eubalaena australis*) e dois Odontocetos (*Physeter macrocephalus* e *Peponocephala electra*). Os registros de áudio revelaram um amplo espectro de comportamentos acústicos, desde espécies nas quais foi observada a ausência de vocalizações (diversos balaenopterídeos) até múltiplas detecções acústicas do animal alvo e seus coespecíficos (*B. borealis* e *P. macrocephalus*). Similarmente, os dados cinemáticos coletados revelaram diferentes padrões de mergulho e, em alguns casos, fortes indícios de comportamento de forrageio.

Entre 2016 e 2018, 12 DTAGs foram colocados com sucesso em sete espécies diferentes de cetáceos (**Figura V.4-26**). Um tagueamento bem sucedido foi definido como qualquer tempo de aderência superior a um minuto.

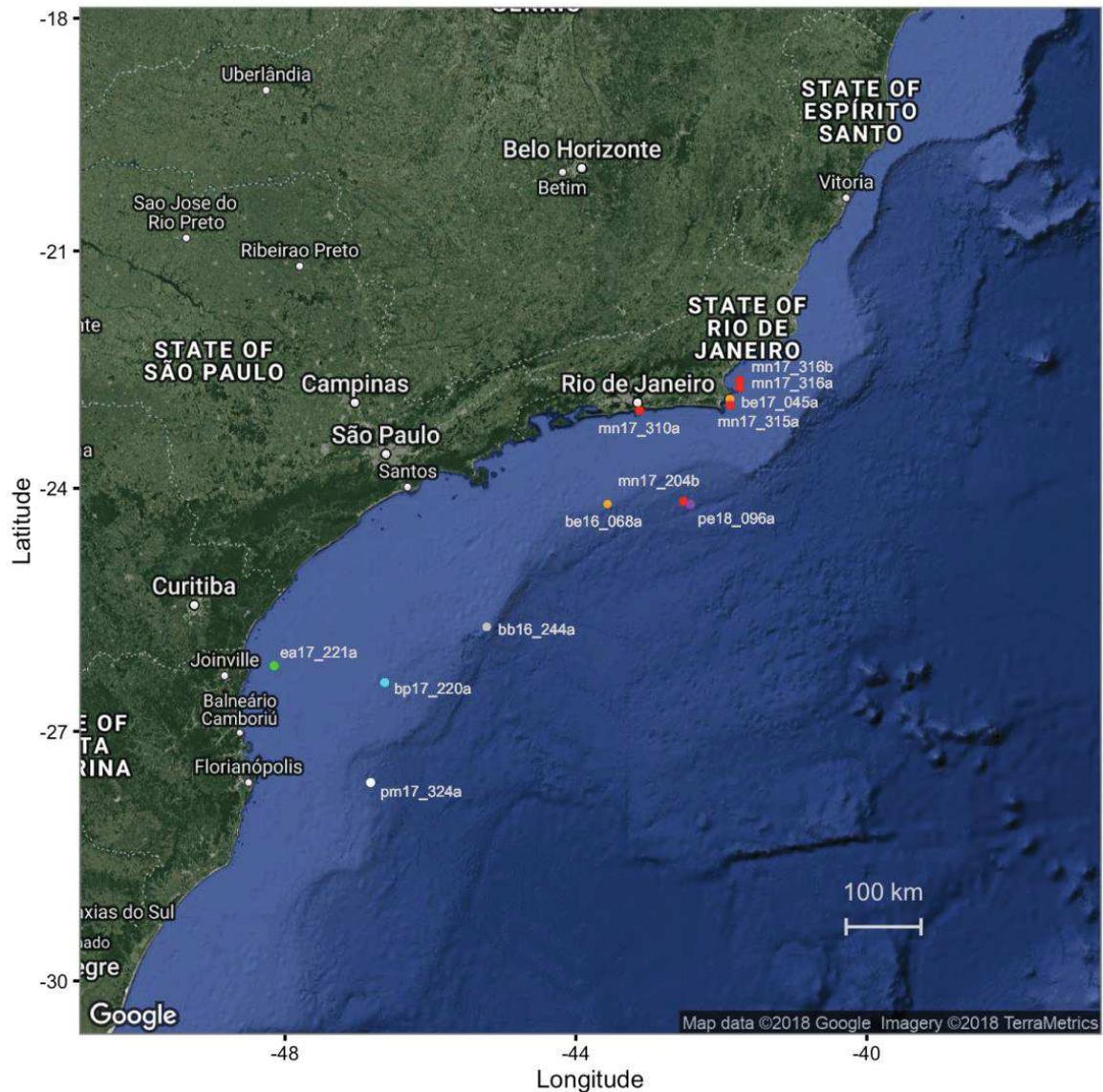


Figura V.4-26: Mapa indicando a espécie e os locais de colocação dos DTAGs (n = 12). Campanhas 1 a 6 de telemetria do PMC-BS. Espécies: *bb* (*Balaenoptara borealis*), *be* (*Balaenoptara brydei*), *bp* (*Balaenoptara physalus*), *ea* (*Eubalaena australis*), *Mn* (*Megaptera novaeangliae*), *pm* (*Physeter macrocephalus*), *pe* (*Peponocephala electra*).

Análise cinematográfica e comportamento de mergulho

A **Tabela V.4-2** mostra que o tempo total de permanência de todos os DTAGs combinados foi de 55 horas e 29 minutos, variando de 4 minutos (*P. electra*) a 12 horas 23 minutos (*M. novaeangliae*). Para todas as espécies tagueadas (excluindo *P. electra* cuja permanência do DTAG durou apenas 4 minutos), o

tempo médio de mergulho se manteve entre 1,3 minutos e 7 minutos (tempo máximo de mergulho entre 4,3 minutos e 16,9 minutos) e a profundidade média de mergulho esteve entre 5,5 metros e 46,4 metros (profundidades máximas entre 28,9 m e 222,9 m). O mergulho mais profundo registrado foi de um indivíduo de *B. brydei* tagueado em área oceânica, já o padrão de mergulho mais raso foi observado em um indivíduo de *B. borealis*, também tagueado em área oceânica.

Os dados cinemáticos e acústicos dos balaenoptrídeos tagueados com DTAGs no PMC-BS sugerem comportamentos associados a forrageio (subida rápida para a superfície, presumivelmente para dar um bote em um cardume de presas). Os dados mostram uma rápida aceleração seguida por uma desaceleração na velocidade de natação (acompanhada de um ruído da água fluindo sobre o DTAG) em conjunto com um aumento dos ângulos de rolagem seguido por um retorno imediato para o ângulo 0°. Os dados que sugerem comportamento de alimentação puderam ser confirmados com diferentes graus de certeza. Entre as evidências estão os acréscimos dos sinais cinemáticos (aceleração geral do corpo e/ou arrancadas repentinas) e os dados acústicos, tais como o ruído de bolhas (que dependendo da posição do DTAG no corpo do animal pode sugerir bolhas passando pelo DTAG no momento em que o animal filtra a água após o bote) (GOLDBOGEN et al., 2007; STIMPERT et al., 2007). O comportamento de forrageio foi mais evidente para os DTAGs colocados em *B. brydei* (be16_068a), *B. borealis* (bb16_244a) e *B. physalus* (bp17_220a), já para *M. novaeangliae* (mn17_204b) as interpretações foram ambíguas.

Um dos resultados mais interessantes foi o da comparação dos sinais cinemáticos e do perfil de mergulho de uma fêmea de *M. novaeangliae* e do seu filhote, ambos tagueados com os DTAGs mn17_316a e mn17_316b, respectivamente. Os registros simultâneos duraram 280 minutos. Notavelmente, os padrões de mergulho apresentaram uma alta correlação ($r = 0.97$), indicando padrões de mergulhos altamente sincronizados (**Figura V.4-27**). A perda da correlação foi em poucas ocasiões, devido a atividades na superfície fora de sincronia, confirmadas por registros tanto visuais quanto acústicos.

Tabela V.4-2: Sumário do padrão de mergulho dos dados de DTAGs dos diferentes indivíduos taguados entre as campanhas 1 a 6 de telemetria do PMC-BS.

Identificador do DTAG	Espécie	Classe Etária	Data	Latitude (local de marcação)	Longitude (Local de marcação)	Duração	Tempo médio do mergulho (Máx.)	Profundidade média de mergulho (Máx.)
be16_068a	<i>B. brydei</i>	Adulto	2016-03-08	24.1937° S	43.5653 °W	1h 31m	2,8 (9,9)	46,4 (222,9)
bb16_244a	<i>B. borealis</i>	Adulto	2016-08-31	25.7192 °S	45.2261 °W	5h 3m	4,9 (11,,2)	5,5 (28,9)
be17_045a	<i>B. brydei</i>	Adulto	2017-02-14	22,87956 °S	41,88221 °W	4h 12m	3,0 (5,7)	6,8 (40,2)
mn17_204b	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-07-23	24,16158 °S	42,52219 °W	1h 54m	1,3 (4,9)	18,2 (54,9)
bp17_220a	<i>B. physalus</i>	Adulto	2017-08-08	26,40248 °S	46,62878 °W	1h 35m	6,8 (16,,9)	12,7 (41,9)
ea17_221a	<i>E. australis</i>	Adulto	2017-08-09	26,19761 °S	48,15024 °W	4h 38m	4,7 (9,7)	11,4 (29,8)
mn17_310a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-06	23,02470 °S	43,12552 °W	6h 41m	7,0 (9,6)	43,0 (60,3)
mn17_315a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-11	22,95315 °S	41,87686 °W	2h 41m	5,6 (10,3)	54,8 (82,3)
mn17_316a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-12	22,73227 °S	41,74666 °W	12h 23m	3,3 (5,4)	39,4 (58,7)
mn17_316b	<i>M. novaeangliae</i>	Filhote	2017-11-12	22,74411 °S	41,74666 °W	4h 30m	3,1 (4,3)	43,5 (60,6)
pm17_324a	<i>P. macrocephalus</i>	Adulto	2017-11-20	27,62148° S	46,82417 °W	10h 17m	3,7 (7,2)	22,7 (72,3)
pe18_096a	<i>P. electra</i>	Adulto	2018-04-06	24,20183 °S	42,42423 °W	4m	0,45 (1,07)*	9,1 (17,0)*
Duração Total:						55h 29m		

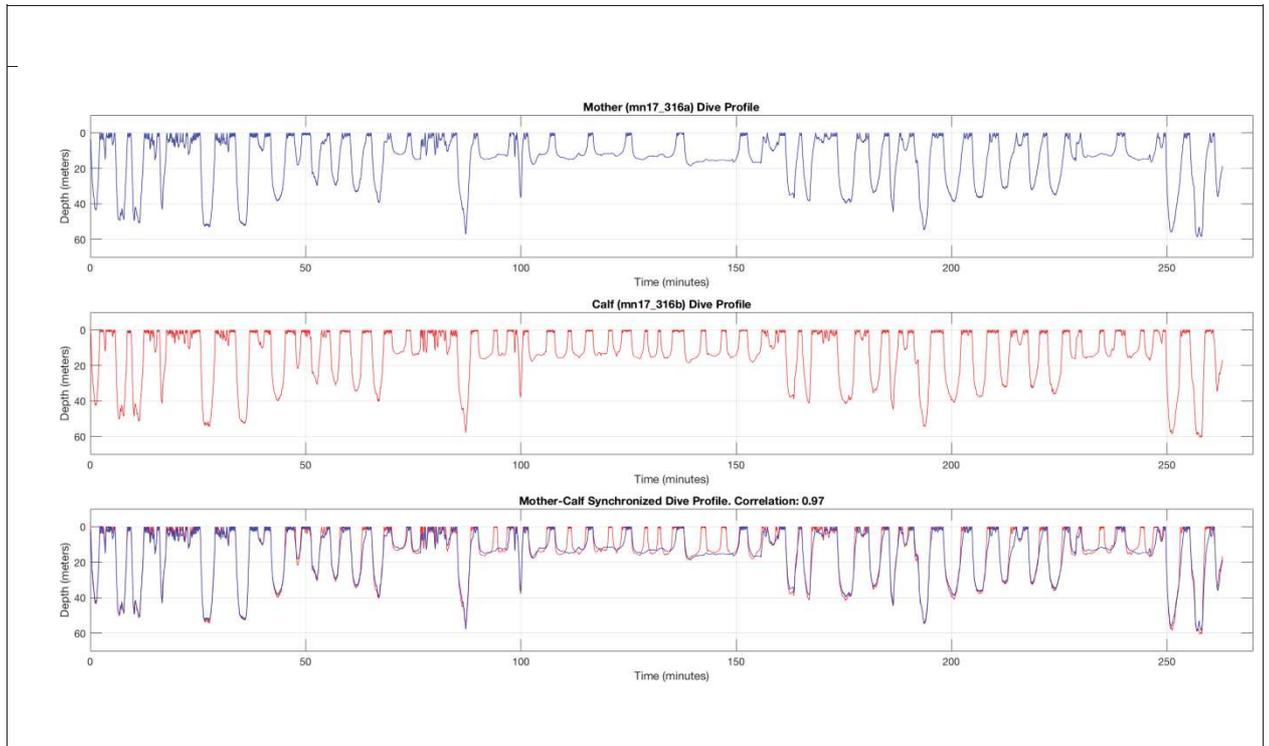


Figura V.4-27: Perfis de mergulho sincronizados entre fêmea e filhote de *M. novaeangliae* (DTAGs mn17_316a and mn17_316b) tagueados com DTAGs nas campanhas do PMC-BS.

Repertório acústico por DTAGs

Um abrangente conjunto de detecções acústicas através dos DTAGs foi coletado durante as seis primeiras campanhas de telemetria do PMC-BS (ver Tabela V.4-3 abaixo).

Tabela V.4-3: Sumário de detecções acústicas coletadas pelos DTAGs durante as campanhas de telemetria 1 a 6 do PMC-BS.

Identificador do Dtag	Espécie	Classe Etária	Data	Duração	Deteções de animais focais e/ou coespecíficos	Deteções de animais não focais e não coespecíficos
be16_068a	<i>B. brydei</i>	Adulto	2016-03-08	1h 31m	Sem detecções acústicas	<i>Stenella</i> spp. (provavelmente <i>S. longirostris</i> ou <i>S. frontalis</i>)
bb16_244a	<i>B. borealis</i>	Adulto	2016-08-31	5h 3m	Chamados de <i>B. borealis</i> . Vocalizações ($n = 23$)	Possível detecção de <i>Orcinus orca</i> ($n = 174$ chamados pulsados; $n = 157$ sequências de cliques)
be17_045a	<i>B. brydei</i>	Adulto	2017-02-14	4h 12m	Sem detecções acústicas	Nenhuma
mn17_204b	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-07-23	1h 54m	Sem detecções acústicas	Nenhuma
bp17_220a	<i>B. physalus</i>	Adulto	2017-08-08	1h 35m	Sem detecções acústicas	Nenhuma
ea17_221a	<i>E. australis</i>	Adulto	2017-08-09	4h 38m	Chamados de <i>E. australis</i> . Vocalizações ($n = 519$)	Possíveis chamados fracos de <i>M. novaeangliae</i>
mn17_310a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-06	6h 41m	Sem detecções acústicas	Nenhuma

Identificador do Dtag	Espécie	Classe Etária	Data	Duração	Deteccões de animais focais e/ou coespecíficos	Deteccões de animais não focais e não coespecíficos
mn17_315a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-11	2h 41m	Sem deteccões acústicas do animal alvo. Chamados fracos provavelmente originados por coespecíficos registrados visualmente	Nenhuma
mn17_316a	<i>M. novaeangliae</i>	Adulto	2017-11-12	12h 23m	Prováveis deteccões do animal alvo. Poucos registros acústicos de boa qualidade e vários de baixa qualidade referentes a deteccões acústicas de coespecíficos	Breve deteccão de um delphinídeos não identificado (cliques de ecolocalização e alguns poucos assovios)
mn17_316b	<i>M. novaeangliae</i>	Filhote	2017-11-12	4h 30m	Sem deteccões acústicas do animal alvo confirmadas. Vários chamados fracos provavelmente originados por coespecíficos registrados visualmente	Nenhuma
pm17_324a	<i>P. macrocephalus</i>	Adulto	2017-11-20	10h 17m	Registros acústicos dominados pelos cliques. Evidências de prováveis codas. Algumas vocalizações em baixa	Nenhuma

Identificador do Dtag	Espécie	Classe Etária	Data	Duração	Detecções de animais focais e/ou coespecíficos	Detecções de animais não focais e não coespecíficos
					frequência, talvez associadas ao filhote	
pe18_096a	<i>P. electra</i>	Adulto	2018-04-06	4m	Numerosos registros de cliques e alguns assovios	Nenhuma
	Duração total:			55h 29m		

Entre estas gravações, o registro de 5 horas e 3 minutos de uma *B. borealis* (bb16_244a) contém várias detecções acústicas do animal focal (n = 23) e, presumivelmente, também de seus coespecíficos. Estas gravações parecem ser as primeiras a serem coletadas para a espécie usando um DTAG, e representam uma contribuição significativa para a pequena coleção de gravações de *B. borealis* reportadas no mundo.

Várias vocalizações acústicas (n = 519) também foram detectadas durante as 4 horas e 38 minutos de gravação do DTAG de *E. australis* (ea17_221a). Preliminarmente, muitas detecções acústicas foram atribuídas para o animal alvo ou seus coespecíficos, porém uma análise acústica posterior, usando o DTAG colocado em *M. novaeangliae* (mn17_316a), sugere a possibilidade de que algumas das detecções originadas em ea17_221a (notoriamente, o chamado do tipo “sirene” seguido pelo “chirp” descritos anteriormente), podem ser de fato associados a *M. novaeangliae* e não ao animal alvo ou seus coespecíficos. Diversas vocalizações, semelhantes a estes chamados dos tipos “sirene” e “chirp”, foram detectadas no DTAG mn17_316a, mas também em uma menor extensão no DTAG mn17_316b, que são os DTAGs colocados em uma fêmea e um filhote de *M. novaeangliae*.

Surpreendentemente, houve poucas vocalizações com uma boa relação sinal/ruído dentre os dados de DTAG coletados para *M. novaeangliae* na 5a campanha de telemetria (Novembro 2017), mostrando categoricamente que a comunicação mãe-filhote foi escassa ou nula. Esse padrão de ausência de comunicação entre mãe e filhote foi aparente nos registros correspondentes a mn17_316a (mãe) e mn17_316b (filhote). Esse padrão também foi evidente no registro do DTAG mn17_310a, no qual um grupo de fêmea e filhote de *M. novaeangliae* foi monitorado acusticamente durante mais de 6,5 horas e não houve nenhuma vocalização detectada.

Em contraste, os registros acústicos coletados pelo DTAG colocado em uma fêmea acompanhada por um filhote recém-nascido de *P. macrocephalus* (pm17_324a), apresentaram diversas sequências de cliques, com muitas vocalizações que frequentemente se sobrepuseram (**Figura V.4-28**).

Muitas dessas sequências de cliques foram coerentes com as características descritas por OLIVERIA et al. (2013), como os cliques “usuais”. Esse tipo de clique foi detectado frequentemente ao longo do período de registro do DTAG, muitas vezes na forma de sequências densas e sobrepostas. Uma análise da diferença do tempo de chegada do sinal - como descrito em JOHNSON et al. (2009), parece indicar que a origem dos cliques foram tanto do animal alvo como de seus coespecíficos, o que fica evidente pelos diferentes ângulos de chegada dos cliques no par de hidrofones do DTAG. A **Figura V.4-28** (abaixo) traz esse fato, que mostra a produção de cliques com ângulos de chegada em 0°, que são originados pelo animal focal, o que é confirmado pela orientação do DTAG nas fotografias e a partir das correções dos registros do acelerômetro feitas no pós-processamento, conforme JOHNSON & TYACK (2003).

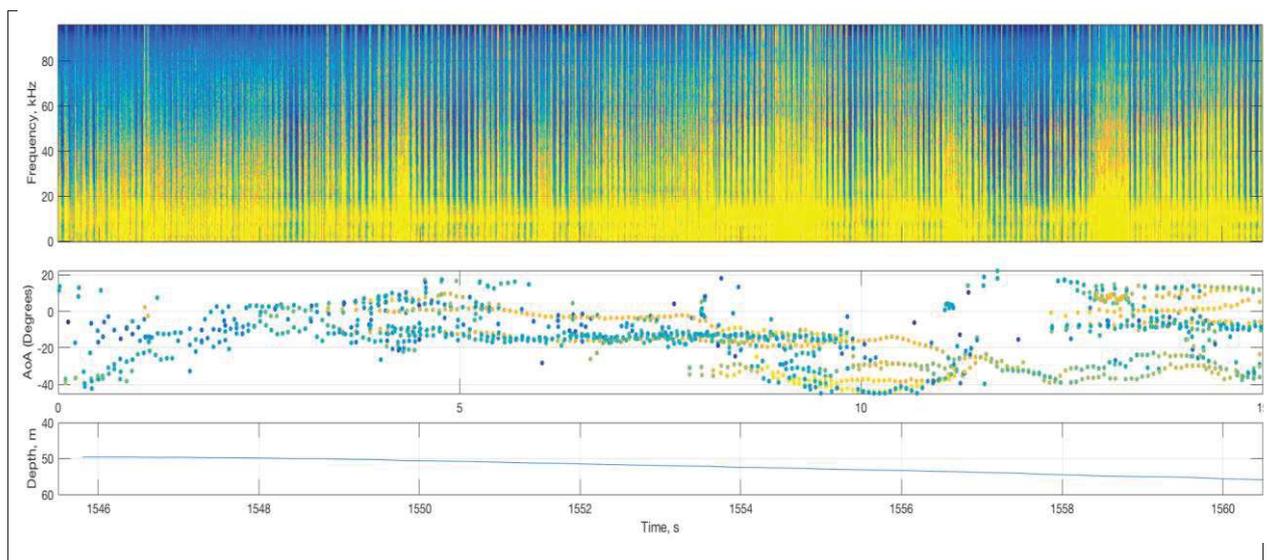


Figura V.4-28: Sequência densa e sobreposta de cliques usuais de *P. macrocephalus* detectados no DTAG pm17_324a em campanhas do PMC-BS.

Durante períodos de menor quantidade de vocalizações nas gravações correspondentes a pm17_324a, houve indícios da presença de codas, conforme descrito por RENDELL & WHITEHEAD (2004). Os codas são utilizados pelos cachalotes para comunicação, fortalecimento dos vínculos sociais e identidade dos grupos ou clãs vocais (RENDELL & WHITEHEAD, 2004; MARCOUX et al.

2006; GERO et al., 2016). Os creaks (também conhecidos como buzzes em outros odontocetos), tal como descritos por SÁNCHEZ-GARCÍA et al. (2010) foram detectados ocasionalmente, assim como algumas vocalizações esporádicas em baixa frequência, provavelmente associadas ao animal alvo ou seu filhote, pois foram detectados com boa relação sinal/ruído.

Discussão – Balaenoptera brydei e B. borealis

Os registros de DTAGs obtidos para *B. brydei* e *B. borealis* fazem parte de uma coleção de dados limitada ou até inédita, no caso de *B. borealis*. Como já foi mencionado em relatórios anteriores, apenas uma publicação (CONSTANTINE et al., 2015) sobre o uso de DTAGs em *B. edeni* foi publicada. O estudo incluiu 7 indivíduos e 62,5 horas de dados de DTAG na Nova Zelândia, com o objetivo de avaliar o potencial de colisões das baleias com embarcações, uma causa significativa de mortalidade de *B. edeni* na região. As baleias tagueadas passaram 91% do tempo em profundidades de 14 m ou menos, expondo os animais a riscos de colisão com os navios que transitavam na região. Na Bacia de Santos, registros fotográficos coletados durante tentativas de colocação de DTAGs em *B. brydei* ao longo da região costeira também mostraram indícios de animais com lesões consistentes com colisões com embarcações.

A baleia-de-Bryde tem se mostrado uma espécie com comportamento esguio e de difícil aproximação. O uso de um bote mais silencioso para marcar potenciais alvos de *baleia-de-Bryde* pode aumentar a eficiência na obtenção de dados de DTAG para a espécie, conforme verificado em cruzeiros de pesquisa para colocação de DTAGs em espécies de balaenopterídeos com comportamento esguio similar (NOWACEK, comunicação pessoal). Até o presente, dados de DTAG de *B. brydei* foram coletados em duas ocasiões, uma no ambiente costeiro e outra em oceânico. Os dados de DTAGs coletados até o presente estão contribuindo para um entendimento melhor do comportamento desta espécie comum, mas pouco conhecida, de balaenopterídeo.

O DTAG colocado em *B. borealis* no dia 31 de agosto de 2016 continua a ser um dado inédito. As vocalizações de *B. borealis* foram previamente descritas em relatórios anteriores do PMC-BS, e esforços serão direcionados para a publicação

dos dados, em função da a escassez de conhecimentos de bioacústica para a espécie.

A espécie deve continuar a ser uma das prioridades durante os esforços de marcação com DTAGs nas próximas campanhas de telemetria. Recentes avistagem de grandes grupos de baleias-sei, registradas por membros da equipe da telemetria na região oceânica da Bacia de Santos, reforçam as oportunidades de se investigar esta espécie pouco conhecida. Tentativas de colocação de DTAGs por períodos mais longos (ex: 24h) poderiam ser feitas para entender melhor o comportamento da espécie. Outra sugestão para o estudo de ecologia alimentar das baleias é o uso de sensores acústicos e técnicas de imageamento (*active acoustic backscatter*) para fazer um mapeamento das camadas na coluna da água e avaliar a presença de potenciais presas das baleias, como cardumes de peixes e zooplâncton (HAZEN et al., 2009; WITTEVEEN et al., 2014). Tais estudos teriam o objetivo de entender como as baleias estão utilizando o habitat e os tipos de presas usadas para alimentação na região.

Discussão – Megaptera novaeangliae e Eubalaena australis

Em relação aos dados de bioacústica do DTAG da baleia-franca, foram descritas previamente vocalizações que pareciam ser novas para *E. australis*, especificamente aquelas descritas como “sirene” e “sirene com uma variante ascendente” e o “chirp” (o qual é quase sempre acompanhado por estes últimos na sequência) (ver **Figura V.4-29**, abaixo).

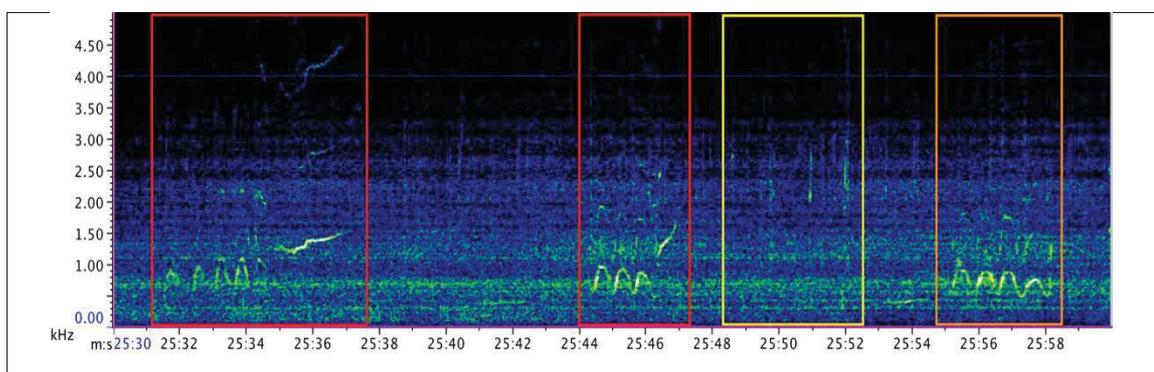


Figura V.4-29: Vocalizações detectadas no DTAG da baleia-franca (ea17_221a): “Sirene com variante ascendente” (vermelho), “Sirene” (laranja) e “Chirps” (amarelo).

Apesar de afirmações de que estas vocalizações poderiam ser novas para a baleia-franca, foram detectadas vocalizações semelhantes em análises subsequentes de registros acústicos de DTAGs em *M. novaeangliae* coletados durante a 5ª Campanha de Telemetria do PMC-BS. Esses registros foram feitos nos DTAGs mn17_315a, em 11 de novembro de 2017, e mn17_316a, em 12 de novembro de 2017 (**Figura V.4-30**), e sugerem uma hipótese alternativa para a origem dessas vocalizações.

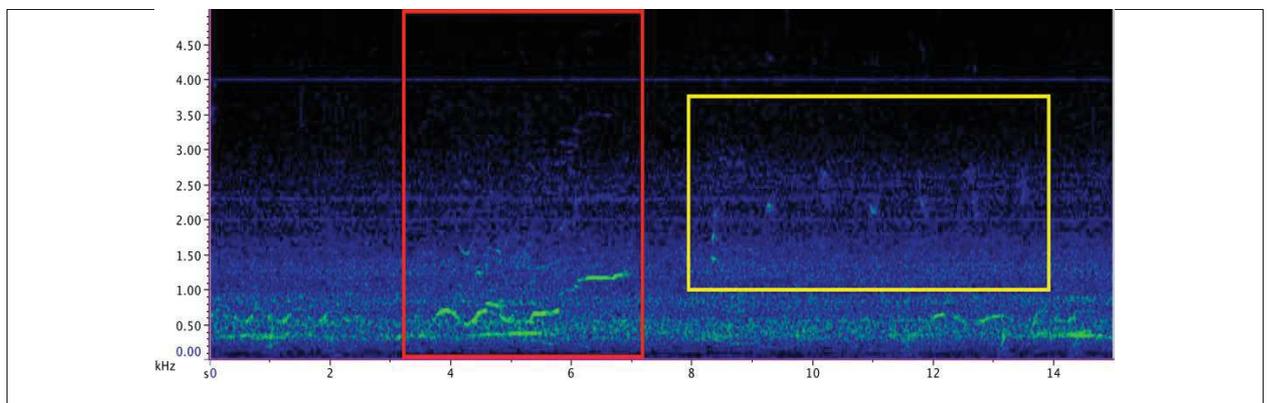


Figura V.4-30: Vocalizações detectadas no DTAG da baleia-jubarte (mn17_316a): “Chamado de sirene com variante ascendente” (vermelho) e “Chirps” (amarelo).

Durante o encontro associado com a gravação correspondente ao DTAG ea17_221a, somente indivíduos de *E. australis* foram detectados visualmente. De maneira semelhante, tanto em mn17_315a quanto em mn17_316a, apenas indivíduos de *M. novaeangliae* foram detectados visualmente.

Pela evidência associando, provavelmente, *M. novaeangliae* com essas vocalizações, parece mais plausível que os sinais do tipo “Sirene” detectados nos registros de ea16_221a tenham sido originados de *M. novaeangliae* que não foram detectados visualmente, e não por coespecíficos de *E. australis*, como proposto originalmente. Estudos futuros de DTAG para ambas as espécies podem ajudar a provar esta hipótese reformulada.

As tentativas bem sucedidas de uso dos DTAGs em baleias-jubartes incluiu

um macho (mn17_315a), duas fêmeas com filhotes (mn17_310a e mn17_316a) e um filhote (mn17_316b). Os dados forneceram um entendimento convincente da ecologia acústica e relação comportamental entre mãe e filhote. Dentre os detalhes observados, a sincronia no comportamento de mergulho entre a mãe (mn17_316a) e o filhote (mn17_316b) ao longo dos 280 minutos nos quais os DTAGs registraram dados simultâneos foi notável. Talvez ainda mais notável foi a aparente ausência de qualquer vocalização com uma boa relação sinal-ruído durante as 4 horas e 30 minutos de interação da mãe mn17_316a com o filhote mn17_316b. Na verdade, a falta de comunicação acústica foi observada ao longo de toda a gravação de mn17_316a, totalizando 12 horas e 23 minutos. Além disso, outra fêmea que foi tagueada e estava acompanhada de um filhote (mn17_310a), aparentemente também não vocalizou durante as 6h e 41 minutos de registros do DTAG.

Uma hipótese que pode explicar a falta de comunicação entre as mães e os seus filhotes pode estar relacionada aos esforços por parte das mães para evitar a atração de machos. O par mãe e filhote (mn17_316a e mn17_316b) foi inicialmente observado acompanhado de um provável macho. No dia anterior, um macho havia sido tagueado com o DTAG (mn17_315a), mas fotografias confirmaram que se tratava de um indivíduo diferente daquele observado junto ao par mn17_316a e mn17_316b. Além desses dois machos desconhecidos, outras baleias-jubartes também foram avistadas, embora o sexo ou a classe etária não tenham sido documentados. Pode ser que as mães e os filhotes de jubarte permaneçam em silêncio durante longos períodos para evitar os custos associados das interações com machos sexualmente ativos (CRAIG et al., 2014; PACK et al., 2017). Evitar a comunicação acústica pode ser benéfico para a mãe e o filhote, já que reduz o custo de deslocamentos associados aos grupos competitivos, que perseguem fêmeas e podem ameaçar o filhote durante as interações macho-macho ou fêmea-macho (CRAIG et al., 2014).

As águas entre o Rio de Janeiro e Cabo Frio têm se mostrado abundantes em pares de fêmeas e filhotes de baleias-jubartes, assim como também da presença de machos que podem estar sexualmente ativos. As campanhas de Avistagem e MAP do PMC-BS detectaram a presença de canto da baleia-jubarte nessas

regiões, que são vocalizações produzidas apenas por machos, mostrando indícios de que a região é uma área de reprodução. Durante as atividades de campo, a documentação precisa do sexo e da faixa etária do animal alvo e dos coespecíficos pode ajudar a elucidar a hipótese de que a ausência de vocalizações seja uma estratégia das fêmeas com filhotes de evitar o assédio de machos.

Discussão – Physeter macrocephalus

O DTAG pm17_324a foi colocado em uma fêmea de *P. macrocephalus* acompanhada de seu filhote no dia 20 de novembro de 2018 e fornece novas perspectivas em relação à ecologia acústica dos cachalotes na Bacia de Santos. Durante esse encontro, o cachalote tagueado estava na companhia de um filhote provavelmente recém-nascido, e ambos formavam parte de um grupo maior, composto aproximadamente por 15 animais. Esse grupo, por sua vez, fazia parte de uma agregação maior de cachalotes observados na área, contendo entre 45 a 50 animais. Os registros do DTAG colocado no indivíduo de cachalote duraram 10 horas e 17 minutos. Foi verificada a presença dos cliques “usuais” e *creaks* (com intervalos entre cliques de 10 a 15 minutos, conforme reportado em SÁNCHEZ-GARCÍA et al. (2010); também foi verificada a presença de cliques com padrões estereotipados, geralmente de 3 a 10 cliques com espaçamentos temporais regulares (**Figura V.4-31**), uma forte evidência de que são vocalizações do tipo codas, utilizadas durante a socialização dos cachalotes (RENDELL & WHITEHEAD, 2004).

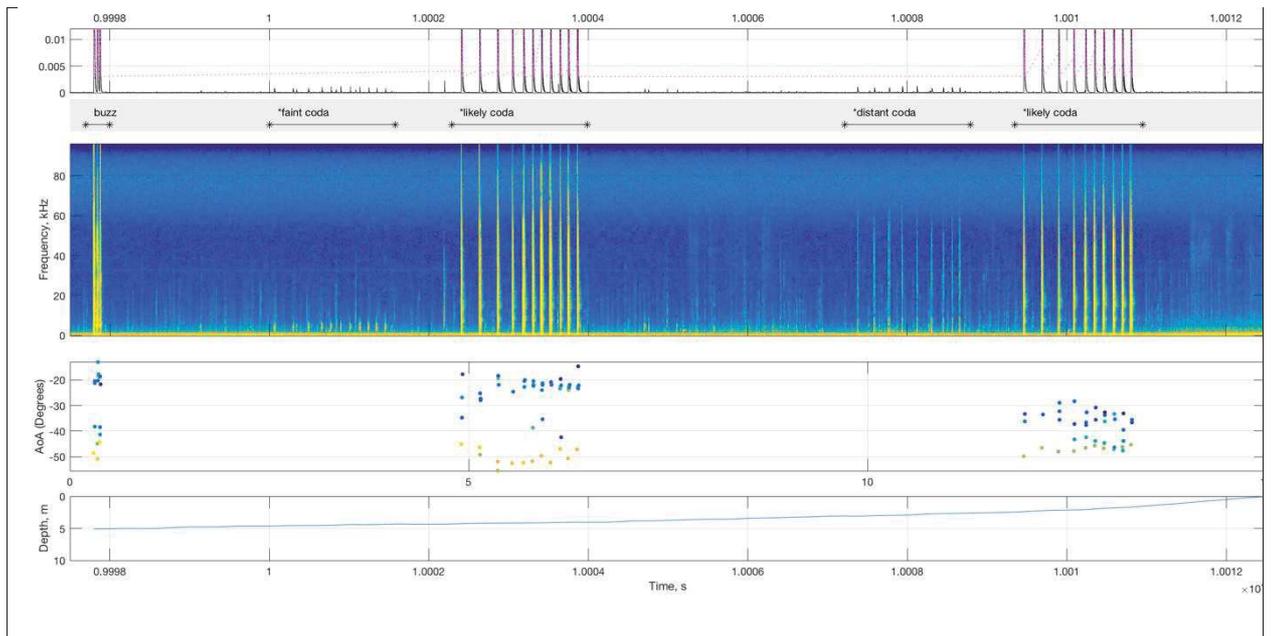


Figura V.4-31: Exemplos de prováveis codas de *P. macrocephalus* detectados no DTAG pm17_324a.

Adicionalmente, vocalizações de baixa frequência também foram detectadas; e dado o bom sinal-ruído dessas vocalizações, é possível que uma ou mais delas estejam associadas com o filhote da fêmea pm17_324a. Os resultados do DTAG do cachalote fornecem uma perspectiva preliminar. Os possíveis codas serão analisados em detalhe para quantificar os intervalos entre os cliques; o processamento dos dados pode ajudar a elucidar se os potenciais codas estão sendo produzidos pelo animal focal, por outros indivíduos ou por todo o grupo em comparações com outras regiões geográficas (RENDELL & WHITEHEAD, 2004; ANTUNES et al., 2011; JOHNSON et al., 2009). Na medida do possível, as campanhas de telemetria devem continuar a priorizar os esforços de DTAG desta população de cachalotes para caracterizar a ecologia acústica e comportamental da espécie na Bacia de Santos.

V.4.3 Repertório acústico – cliques

Os cliques são sons produzidos por odontocetos para exploração do ambiente, navegação e captura de presas. Para isto, os animais emitem os cliques direcionados a objetos e recebem os ecos, que são interpretados para obter informações sobre seu ambiente na forma de uma “imagem acústica”. Os cliques são sons pulsados, ultrassônicos e de alta intensidade, emitidos em seqüências, conforme o animal investiga objetos e o ambiente ao redor. Um clique é emitido logo após a recepção do eco do clique anterior, portanto, é emitido em intervalos regulares, que variam de acordo com a distância do objeto investigado (AU, 1993). A **Figura V.4-32** ilustra uma detecção de cliques de um odontoceto realizada no PMC-BS. Note que os cliques são emitidos em intervalos regulares, mas variáveis. As frequências dos cliques podem chegar a picos entre 100 - 130 kHz, portanto, se propagam por distâncias menores que, por exemplo, os assovios produzidos para comunicação. Os cliques são direcionais, levemente acima do eixo longitudinal do animal. São transmitidos em feixes com uma largura entre 10° a 16°, considerando um decaimento de - 3 dB (AU, 1993; AU et al., 2012).

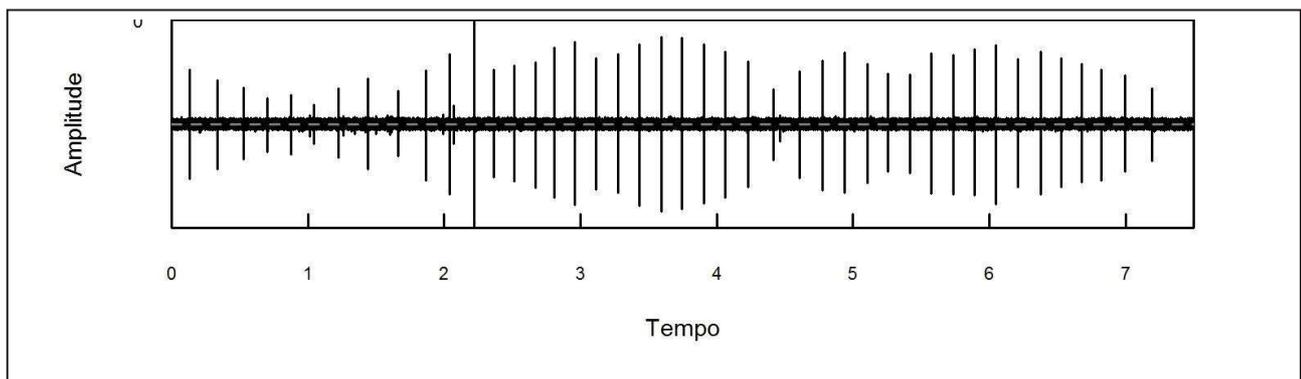


Figura V.4-32: Exemplo de uma seqüência de cliques de um odontocetos registrado no PMC-BS.

As características de frequência e de tempo dos cliques podem variar entre as espécies. Por isso, eles têm o potencial de serem utilizados para identificação

e classificação de espécies, como já foi demonstrado para o cachalote (*Physeter macrocephalus*), baleias-bicudas (família Ziphiidae) e algumas espécies da família Delphinidae (MOHL et al., 2003; BAUMANN-PICKERING et al., 2013; SOLDEVILLA et al., 2008; BAUMANN-PICKERING et al., 2015).

Como parte dos esforços para a caracterização e avaliação da possibilidade de identificação de espécies por meio dos dados de acústica no PMC-BS, são apresentadas as análises e processamento dos cliques de quatro táxons de odontocetos: gênero *Kogia*, Família Ziphiidae (baleias-bicudas), golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*) e a orca-pigméia (*Feresa attenuata*).

Processamento de Cliques

As análises foram feitas primeiramente de forma manual, com a edição de trechos das gravações originais contendo os cliques a serem processados. Esses trechos foram então processados utilizando o programa analisador de cliques do PMC-BS (**Figura V.4-33**). O programa é baseado em LabView (National Instruments) e apresenta uma interface gráfica que permite que os cliques sejam visualizados e selecionados manualmente. Os parâmetros dos cliques selecionados são extraídos de um tamanho de janela predefinido. Foi definida uma janela de análise de FFT de 600 pontos centralizada no clique, correspondendo a 2 ms para a taxa de amostragem de 500 kHz. Os seguintes parâmetros foram extraídos dos cliques: Frequência de Pico (kHz), Frequência Central (kHz), Largura de Banda -3 dB, -10dB e RMS (kHz) e Duração 95% (μ s). Apenas cliques com boa relação sinal/ruído foram selecionados para as análises; os cliques muito fracos foram descartados.

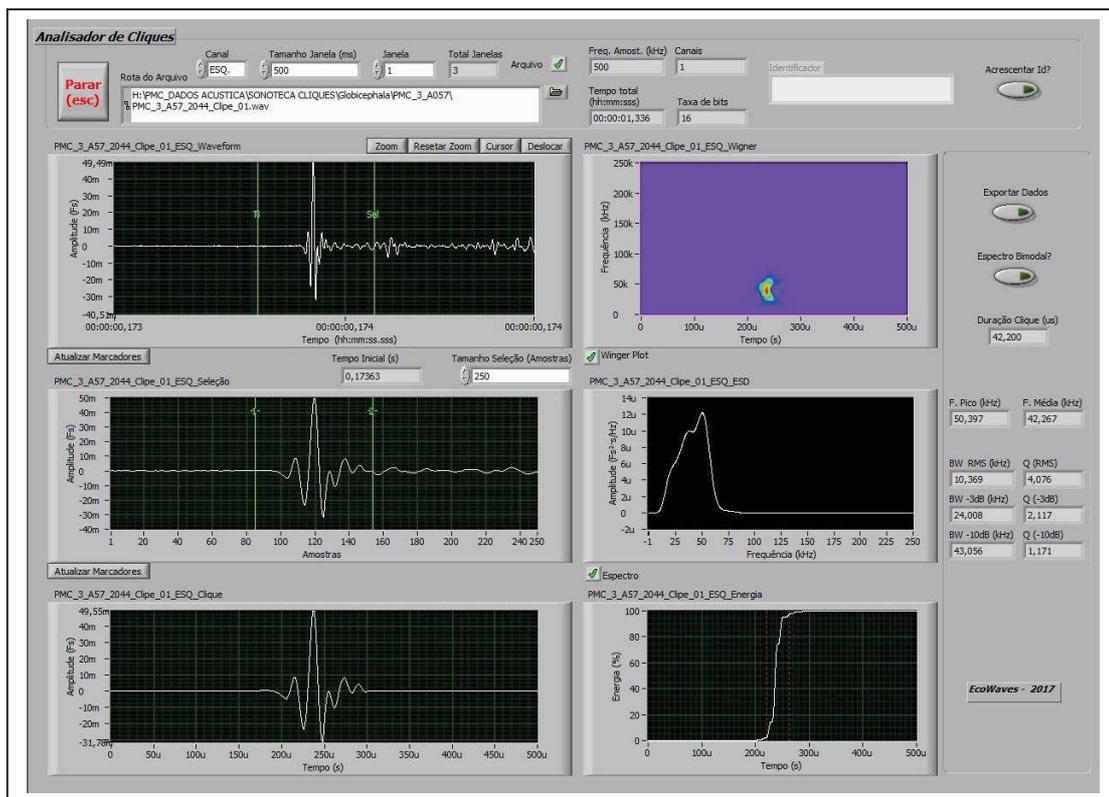


Figura V.4-33: Interface Gráfica do programa analisador de cliques desenvolvido pelo PMC-BS para visualização, seleção e análise de cliques de odontocetos.

Para extração do intervalo entre os cliques (ICI) foi utilizado o programa PAMGUARD (GILLESPIE et al., 2008). A base de dados e os arquivos binários gerados durante a coleta de dados foram utilizados para processar e extrair os valores de ICI dos cliques detectados para as diferentes espécies consideradas. Os cliques são selecionados e atribuídos manualmente a um evento. Somente períodos com sequências de cliques claras e distintas foram usados para obter os intervalos entre os cliques. O módulo do ROCCA no PAMGUARD serviu para a extração do ICI. Os valores muito discrepantes foram excluídos e foi calculada a média, mínimo, máximo e desvio padrão dos valores de ICI.

Por último, a metodologia de processamento e análise dos cliques foi diferenciada para os registros feitos da baleia-bicuda (zifídeos). O objetivo foi fazer uma análise mais detalhada dos encontros acústicos, para extrair o máximo

de cliques possível para uma caracterização e comparação dos resultados com a literatura.

Primeiramente, o áudio original foi processado no programa PAMGUARD, utilizando o detector de cliques. Os parâmetros do detector foram definidos dentro do módulo "*Click Detector*", usando um trigger com um limite de 10 dB acima do ruído de fundo. Um módulo de classificação de cliques foi usado para identificar possíveis cliques de baleia-bicuda, com a opção "*Classifier with frequency sweep*".

Um filtro de banda entre 30 a 70 kHz foi usado antes dos parâmetros serem extraídos de uma janela de 2,5 ms em torno do centro do clique. Para serem classificados como potenciais cliques de baleia-bicuda, as detecções precisavam conter entre 5-50 cruzamentos em zero e conter uma modulação de frequência com cruzamentos em zeros com uma taxa entre 15-1000 kHz / ms. Todos os potenciais cliques de baleia-bicuda foram examinados por meio da análise das séries temporais (forma da onda) e do gráfico de Wigner-Ville no PAMGUARD. Detecções que foram confirmadas como cliques de baleia-bicuda foram então exportadas para o R para a extração de características importantes na classificação de espécies. Todos os dados foram filtrados com um filtro passa-altas de 10 kHz (Butterworth de 4ª ordem). A frequência de pico, frequência central, largura de banda a -10 dB e largura de banda a -3 dB foram calculadas para cada clique. Os espectros foram calculados usando uma janela Hann de 2,5 ms centrados no sinal.

Descrição e discussão sobre os cliques de Kogia

No total, foram 14 detecções de *Kogia*, sumarizadas na **Tabela V.4-4**. Foram analisados 669 cliques. Houve detecções com centenas de cliques qualificados para análise e outras com poucos ou nenhum, apesar de confirmados como pertencentes à *Kogia*. Em uma ocasião (PMC_5_A90), problemas técnicos impediram a gravação. Para o cálculo do ICI 897, cliques foram extraídos do PAMGUARD.

Tabela V.4-4: Sumários das detecções acústicas de *Kogia* registradas no PMC-BS e número de cliques extraídos para análise.

Código ID MAP	Data	Profundidade (m)	No Cliques
PMC_1_AP06	18/12/2015	1794	02
PMC_1_AP07	18/12/2015	2319	0
PMC_2_AP05	15/06/2016	2539	72
PMC_3_A028	04/10/2016	2036	01
PMC_3_A040	05/10/2016	1981	291
PMC_3_A075	14/10/2016	1384	136
PMC_3_A138	01/11/2016	2207	08
PMC_4_A038	21/03/2017	2264	03
PMC_4_A041	21/03/2017	1825	01
PMC_5_A029	02/09/2017	1930	180
PMC_5_A090	17/09/2017	1625	0*
PMC_5_A093	18/09/2017	2629	18
PMC_5_A106	23/09/2017	1629	59
PMC_6_A070	11/02/2018	2201	0
Total	-	-	771

* Problemas técnicos, não houve gravação.

No geral, as detecções foram muito breves (entre 1 e 3 minutos). Em apenas três delas foi possível extrair mais de 100 cliques de qualidade. A **Figura V.4-34** apresenta um clique de *Kogia*. A onda possui inúmeras oscilações, com decaimento gradual de energia e uma cauda alongada. A duração média do pulso foi de 199 μ s. A banda é bem estreita (largura da banda -10dB de 1,7 kHz). A frequência foi mais alta que aquelas típicas para os delfinídeos, a frequência pico foi de 126,6 kHz e a frequência central de 127,1 kHz.

A **Tabela V.4-5** sumariza os resultados obtidos. A **Figura V.4-35** ilustra um exemplo do espectro de um clique de *Kogia* sp. e a **Figura V.4-36** o gráfico de Winger-Ville. Os cliques variaram muito pouco quanto ao seu conteúdo espectral, com um único pico acentuado em cerca de 120 - 130 kHz.

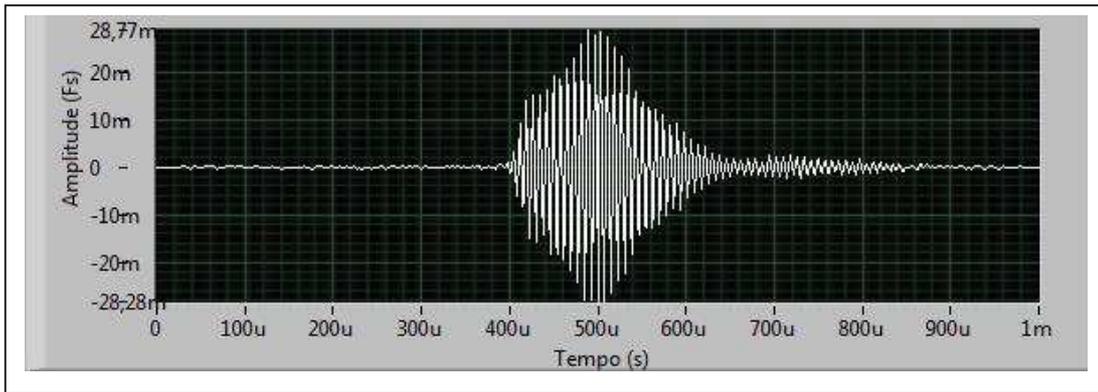


Figura V.4-34: Forma da onda de um clique de *Kogia sp.* O pulso apresenta inúmeras oscilações com decaimento gradual de energia e uma cauda alongada.

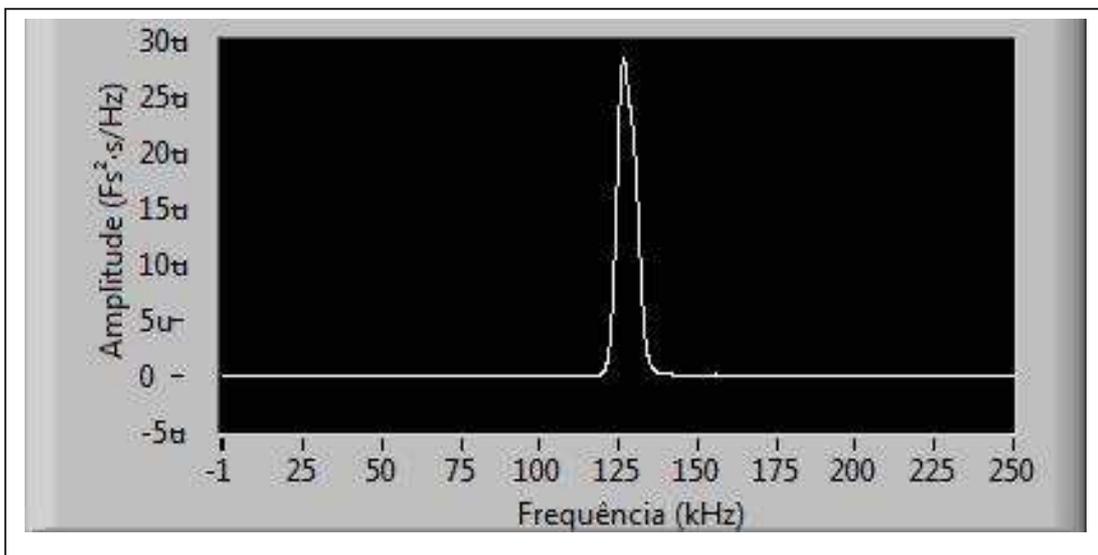


Figura V.4-35: Espectro de frequência de um clique de *Kogia*. Os cliques apresentam uma banda estreita e um único pico em cerca de 125 - 130 kHz.

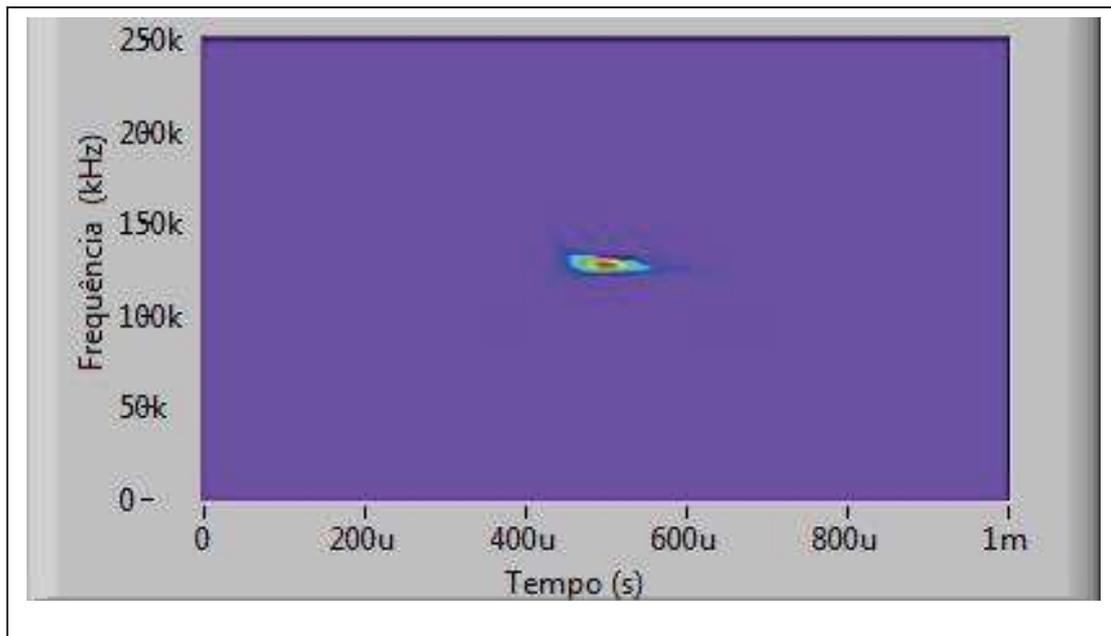


Figura V.4-36: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique de *Kogia*. O clique apresenta pico de frequência alto, banda estreita e duração em cerca de 200 μ .

Tabela V.4-5: Resultados da análise de cliques ($n= 669$) de *Kogia sp.*, incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

Parâmetro	Média (min - max)	Min - Max	Desvio Padrão	CV
Frequência Pico	126,6	119 - 130	1,0	1%
Frequência Central (kHz)	127,1	119 - 130	1,0	1%
Largura da banda -3dB (kHz)	3,7	02 - 07	1,0	26%
Largura da banda -10dB (kHz)	6,8	03 - 11	1,5	23%
Largura da banda RMS (kHz)	1,7	01 - 04	0,4	24%
Duração (μ s)	199	107 - 485	5,0	26%
Intervalo entre cliques (ms)	145	84-377	40	28%

As detecções de *Kogia* reportadas no PMC-BS foram similares a outros estudos reportados para o gênero (MARTEN et al., 2005; MADSEN et al., 2005, MERKENS et al., 2018).

Até o momento, todas as campanhas produziram registros acústicos de *Kogia*, o que mostra que a espécie é relativamente comum. Recentemente, novos

registros acústicos de *Kogia* foram publicados para o Atlântico Norte e Pacífico Norte. MERKENS et al. (2018) analisaram cliques do cachalote-pigmeu (*Kogia sima*) em ambiente natural nas raras oportunidades em que a espécie foi confirmada visualmente. Os cliques reportados foram semelhantes aos resultados do PMC-BS, quando consideradas as frequências pico e central (127 kHz). MADSEN et al. (2005) reportaram valores um pouco mais altos para os cliques de um cachalote-pigmeu (*Kogia breviceps*) gravado em cativeiro, com valores de frequência pico e central de 130 kHz e 129 kHz, respectivamente. A largura da banda -3dB, -10dB e RMS foi menor nos dados do PMC-BS (4 kHz, 7 kHz e 2 kHz, respectivamente) que aqueles reportados por MERKENS et al. (2018) (8,6 kHz, 13 kHz e 7 kHz) e MADSEN et al. (2005) (-3dB de 8 kHz e -10 dB de 15 kHz). A duração média foi similar aos resultados de MERKENS et al. (2018) (199 μ s) e mais longa do que MADSEN et al. (2005) (119 μ s). O ICI observado (145 ms) está entre os valores observados por MERKENS et al. (2018) para os cliques usuais em ambiente natural (110 - 164 ms).

MADSEN et al. (2005) observaram pouca variação na frequência pico e central de cliques no eixo e fora do eixo à frente do animal nas gravações em cativeiro, indicando que os cliques de *Kogia* não sofreram as distorções na frequência dependendo da geometria de como são detectados, como ocorre para delfínidos e cachalotes, por exemplo. De fato, os cliques detectados no PMC-BS foram bastante consistentes quanto às suas características, principalmente a frequência pico e central, apesar de que os cliques foram provavelmente captados de diferentes geometrias entre o hidrofones e o animal emissor (geometria desconhecida). A pouca variabilidade nas características dos cliques facilita a classificação confiável de *Kogia*.

A duração, no entanto, teve uma variação muito grande. Cliques com duração muito longa podem estar associados a amostras de cliques com relação sinal/ruído mais baixa ou captados de reflexos da superfície. Cliques fracos ou refletidos podem artificialmente aumentar a duração do sinal, como foi sugerido nas observações feitas por MERKENS et al. (2018). Cliques com relação sinal/ruído muito baixa, nos quais a duração alcançou valores mais altos que 500 μ s, foram excluídos dos resultados apresentados.

Os cliques de *Kogia* são denominados do tipo NHBF (do inglês “*narrow band high frequency*” (MADSEN et al., 2005). Uma possibilidade considerada foi de os cliques pertencerem a outros odontocetos que produzem cliques do mesmo tipo. No entanto, a única espécie de ocorrência comum na Bacia de Santos que produz cliques semelhantes é a toninha (*Pontoporia blainvillei*) (MELCÓN et al., 2012), que, por ser uma espécie costeira, dificilmente seria encontrada em águas profundas. Outras espécies que produzem cliques NHBF, como do gênero *Cephalorhynchus* e *Lagenorhynchus* ou da família Phocoenidae, são raros na Bacia de Santos e, mesmo assim, de hábitos mais costeiros. A única espécie que pode fazer incursões oceânicas é o boto-de-óculos (*Phocoena dioptica*) da família Phocoenidae, mais comum em águas temperadas frias (LODI & BOROBIA, 2013). Não existem descrições na literatura dos cliques produzidos pelo boto-de-óculos. Outras espécies da família Phocoenidae são conhecidas por produzir cliques com frequência de pico um pouco mais alta (~130 kHz) que *Kogia* (KHYM et al., 2013). Os resultados, portanto, apontam para *Kogia* a classificação dos cliques aqui apresentados.

Pela dificuldade de observação e identificação no campo, além da escassez de registros acústicos, até o momento não é possível diferenciar as duas espécies do gênero *Kogia* pelos cliques. Na Bacia de Santos, as espécies são simpátricas, portanto, existe a possibilidade de que os cliques detectados pertençam a uma ou às duas espécies. Pela comparação com outros estudos, verificou-se que não há grandes diferenças nas frequências de pico e central dos cliques de *Kogia sima* reportadas para o Atlântico Norte e Pacífico Norte (MERKENS et al., 2018) comparados aos dos cliques mencionados neste estudo.

As detecções de *Kogia* são geralmente breves e com poucos cliques, provavelmente pelo fato de os animais emitirem os cliques em mergulhos profundos, combinados à forte atenuação que o clique sofre, mesmo em distâncias curtas, porque a frequência pico é muito alta. Apesar das dificuldades, o monitoramento acústico passivo permitiu registrar a presença de *Kogia*. Enquanto 14 registros foram feitos pelo MAP para as seis campanhas de MAP e Avistagem, nenhum registro foi feito pela equipe de avistagem. Mesmo considerando as campanhas de telemetria e monitoramento aéreo, um único

registro visual proveniente de uma campanha de telemetria foi feito para *Kogia* sp. até o presente no PMC-BS. No entanto, dados de MAP estão mostrando que o gênero é relativamente frequente na Bacia de Santos. A falta de registros visuais se deve ao fato de ser um grupo de cetáceo críptico. Índícios provenientes de encalhes já apontavam para o fato de o grupo *Kogia* não era tão raro. Entre 1965 e 2014, cem registros de encalhes foram reportados de norte ao sul da costa do Brasil (MOURA et al., 2016).

Em um estudo no Atlântico Norte, HODGE et al. (2018) analisaram gravações provenientes de gravadores autônomos e consistentemente encontraram centenas de detecções de *Kogia* nas gravações, apesar de que, em cruzeiros de avistagem na mesma região, *Kogia* foi detectado uma única vez. Portanto, para espécies crípticas, a falta de avistagem não necessariamente significa que a espécie seja rara ou ocasional em uma área. O uso do MAP permitiu detectar a presença relativamente frequente de *Kogia* na Bacia de Santos, que, do contrário, não teria sido possível apenas pelo esforço visual. Os estudos utilizando o MAP abrem a possibilidade de avaliar a ocorrência e distribuição do gênero na região. As detecções feitas no PMC-BS indicam uma preferência de *Kogia* por águas acima dos 1.000 m. A profundidade dos locais de ocorrência variou entre 1.384 m e 2.629 m. (média 2.025 m). Os registros foram bem distribuídos em áreas do talude inferior e áreas oceânicas (>2.000 m) da Bacia de Santos, com registros tanto na porção norte como sul da bacia.

Descrição e discussão sobre os cliques de zifídeos

Até o terceiro ano do PMC-BS, houve um total de sete registros de zifídeos (denominados encontros acústicos). Detalhes de cada encontro acústico são apresentados na **Tabela V.4-6**. No geral, as detecções foram breves (alguns minutos), com poucos cliques detectados. No total dos sete encontros, 101 cliques foram extraídos para análise.

No geral, os cliques apresentaram as características singulares da maioria dos zifídeos (energia em uma banda de frequência entre 30 - 50 kHz e a modulação de frequência). A forma da onda apresenta diversas oscilações e um formato de “bolha”. A modulação de frequência do clique fica evidente no gráfico

de Wigner-Ville (**Figura V.4-37**).

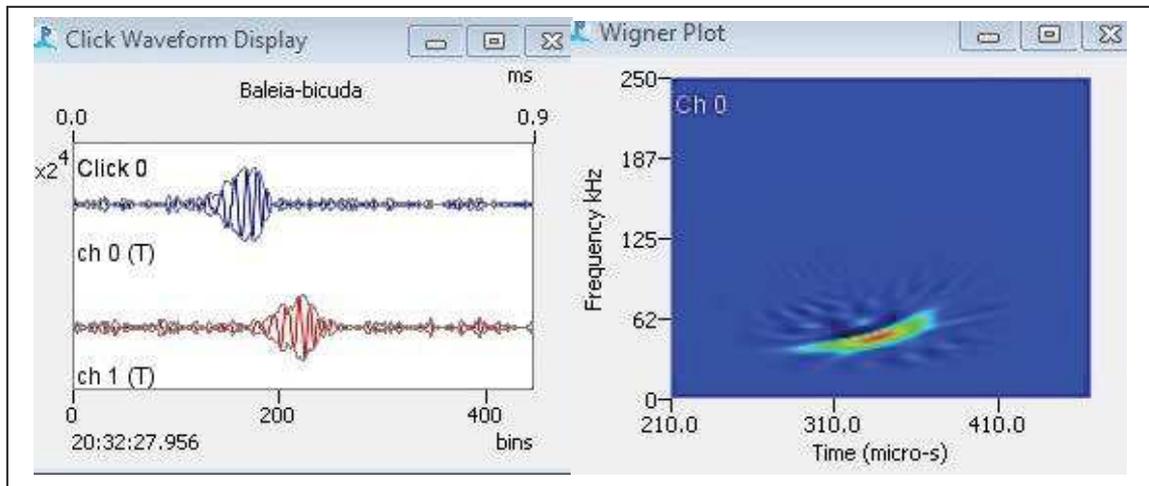


Figura V.4-37: À direita: representação da forma da onda de um clique de baleia-bicuda, mostrando o formato em “bolha” do clique. À esquerda: o gráfico de Wigner-Ville mostrando a modulação de frequência característica do clique (energia se distribui na diagonal).

Com o objetivo de verificar se diferentes espécies de baleias-bicudas poderiam estar presentes durante os diferentes encontros, as análises foram feitas separadamente, tal como sumarizado na **Tabela V.4-6**. Dos sete encontros, três tiveram número amostral muito baixo (menos de 10 cliques) e foram desconsiderados.

Tabela V.4-6: Sumários das detecções acústicas de baleia-bicuda (Ziphiidae) registradas no PMC-BS e o respectivo número de cliques extraídos para análise.

Código ID MAP	Data	Profundidade (m)	No Cliques
PMC_3_AP01	09/10/2016	2149	3
PMC_3_A137	01/11/2016	2497	6
PMC_4_A045	22/03/2017	1095	22
PMC_5_A010	28/08/2017	1909	10
PMC_5_A011	28/08/2017	1727	25
PMC_5_A047	06/09/2017	2085	33

PMC_3_A124	02/10/2017	2221	2
Total	-	-	101

As características observadas dos cliques dos diferentes encontros estão sumarizadas na **Tabela V.4-8**. No geral, os encontros apresentaram cliques com características semelhantes, com pequenas variações das médias obtidas. A frequência pico ficou entre 43 - 48 kHz e a frequência central entre 45 - 50 kHz. A largura da banda em -3dB obteve média entre 5 - 9 kHz e em -10dB entre 20 - 25 kHz. O espectro dos cliques dos diferentes encontros acústicos foi similar, como pode ser observado na **Figura V.4-38**.

Tabela V.4-7: Características observadas dos cliques dos diferentes encontros com baleias-bicudas (Família Ziphiidae) na Bacia de Santos.

Código ID MAP	Frequência Pico			Frequência Central			Largura da banda - 3dB			Largura da banda - 10dB			Provável Espécie
	Média	DP	Min-Max	Média	DP	Min-Max	Média	DP	Min-Max	Média	DP	Min-Max	
PMC_4_A045	44,98	6,7	37,47-60,42	44,85	6,6	29,04-60,55	5,06	3,9	0,96-13,06	20,47	9,9	1,57-36,25	Baleia-bicuda-de-Gervais
PMC_5_A010	45,62	9,7	37,44-63,78	46,63	7,1	38,95-58,91	8,76	5,9	1,60-17,56	20,26	6,9	6,54-31,28	Baleia-bicuda-de-Gervais
PMC_5_A011	48,06	11,1	14,37-66,23	50,18	10,9	14,29-68,99	6,55	5,6	0,87-19,79	20,58	7,7	3,19-37,90	Baleia-bicuda-de-Gervais
PMC_5_A047	43,20	3,5	35,54-50,78	45,29	4,0	39,03-52,60	6,22	5,1	1,54-24,72	24,92	7,3	10,92-38,51	Baleia-bicuda-de-Gervais

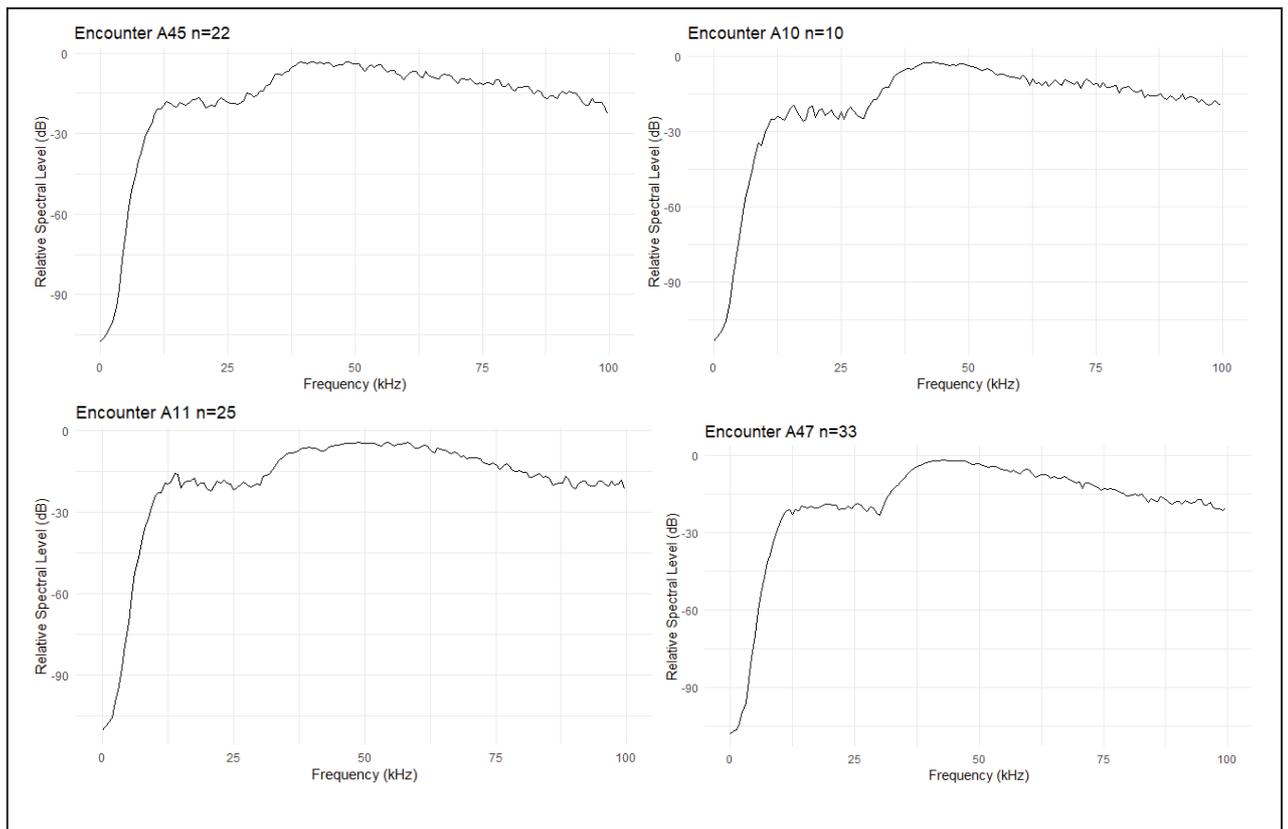


Figura V.4-38: Espectro de frequência dos cliques dos quatro encontros acústicos de zifídeos analisados no PMC-BS.

Considerando-se a revisão sobre a ocorrência de espécies de zifídeos do Atlântico Sul e os cliques descritos na literatura, as características observadas se assemelham mais com as descrições feitas para a baleia-bicuda-de-Gervais (*Mesoplodon europaeus*). No entanto, os resultados devem ser vistos com cautela, por causa do baixo número amostral de cliques por encontro e da falta de conhecimento das características dos cliques de outras espécies que também podem ocorrer no Brasil.

São quatro espécies de zifídeos que ocorrem em águas tropicais e subtropicais com registros confirmados no Brasil (excluindo-se as espécies de águas polares ou temperadas que apresentam raros registros de encalhe, a maioria no sul do Brasil): baleia-bicuda-de-cuvier (*Ziphus cavisrostris*), baleia-bicuda-de-blainville (*Mesoplodon densirostris*), baleia-bicuda-de-gervais (*Mesoplodon europaeus*) e baleia-bicuda-de-true (*Mesoplodon mirus*). Entre

essas espécies, características dos cliques observados são mais semelhantes à baleia-bicuda-de-gervais.

Conforme descrito em BAUMANN-PICKERING et al. (2013a), a baleia-bicuda-de-gervais apresenta frequência pico e central mais alta e uma largura de banda em -10 dB maior que a baleia-bicuda-de-cuvier e a baleia-bicuda-de-blainville. GILLESPIE et al. (2009) fizeram registros acústicos nas Bahamas durante um encontro na presença de um grupo de baleias-bicuda-de-gervais confirmado visualmente. Em outras ocasiões no mesmo cruzeiro, GILLESPIE et al. (2009) registraram cliques da baleia-bicuda-de-cuvier e da baleia-bicuda-de-blainville, e, na comparação entre as espécies, também observaram uma frequência pico um pouco maior para a baleia-bicuda-de-gervais.

O cálculo do intervalo entre cliques (ICI), outro parâmetro que também pode auxiliar na identificação das espécies, não foi possível pela falta de cliques regulares detectados nos encontros. Apenas em uma detecção (PMC_4_A045) foi possível verificar algumas poucas sequências de 3 a 5 cliques regulares ($n = 14$), que permitiram calcular o intervalo entre cliques (ICI). Apesar do número baixo de cliques ($n=14$), que não permitiu uma caracterização robusta do ICI, o valor médio obtido (272 ms) foi notavelmente semelhante ao descrito para a baleia-bicuda-de-gervais (GILLESPIE et al., 2009; BAUMANN-PICKERING et al., 2013).

A despeito da semelhança dos cliques com as características da baleia-bicuda-de-gervais, outras espécies - sem descrições das características dos cliques na literatura, mas com registros de ocorrência no Brasil - não puderam ser avaliadas. Entre essas espécies, a única que é mais comum em águas tropicais e subtropicais é a baleia-bicuda-de-true. O único registro da espécie no Atlântico Sul foi de um animal vivo encalhado em São Vicente (SP) (SOUZA et al., 2005). Outras espécies mais comuns nas águas polares e temperadas também não podem ser excluídas, apesar da prerrogativa de uma ocorrência bem mais rara nas águas da Bacia de Santos. São elas a baleia-bicuda-de-gray, baleia-bicuda-de-layard e baleia-bicuda-de-hector. Todas elas também sem informação das características dos cliques na literatura. A baleia-bicuda-de-arnoux e baleia-bicuda-do-sul podem ser descartadas, pois são animais de maior tamanho que apresentam picos de frequência dos cliques bem mais baixos (DAWSON et al.,

1998; HOOKER & WHITEHEAD, 2002).

Do total de sete registros para os quais foram confirmados cliques de zifídeos no PMC-BS, apenas quatro permitiram extrair 10 ou mais cliques para as análises. Foram poucos cliques por encontro, totalizando 101 cliques, o que mostra a dificuldade para obtenção de um maior número de amostras de cliques. Essas dificuldades estão relacionadas ao comportamento acústico dos zifídeos e à posição dos hidrofones em profundidades muito rasas (20 – 25 m). GILLESPIE et al. (2009) reportaram um encontro visual com a baleia-bicuda-de-gervais que durou cerca de 6 horas, mas os cliques foram detectados uma única vez por cerca de 15 minutos. Os cliques eram fracos e havia descontinuidade nas suas sequências. Os encontros acústicos do PMC-BS foram semelhantes, com duração ainda menor (entre 1 a 6 minutos) e poucos cliques com boa relação sinal/ruído.

O comportamento acústico das baleias-bicuda é conhecido em função de estudos realizados com DTAGs em espécimes da baleia-bicuda-de-blainville e baleia-bicuda-de-cuvier (JOHNSON et al., 2004; ZIMMER et al., 2005c, TYACK, 2006). Os dados revelaram que, apesar das diferenças entre as espécies, no geral, os animais começaram a emitir cliques apenas quando alcançaram profundidades abaixo de 200 m, quando então passaram a clicar continuamente até profundidades de mais de 1.000 m. Durante a subida, os cliques cessaram a uma profundidade de cerca de 700 a 800 m. Os mergulhos profundos duraram, em média, pouco mais de uma hora e os animais emitiram cliques de ecolocalização por 25 - 35 minutos durante o ciclo de mergulho (TYACK, 2006). ZIMMER et al. (2008) fizeram estudos de modelagem e simulações de detecções de cliques de zifídeos. Para hidrofones próximos da superfície, a probabilidade de detecção é baixa, principalmente na fase de descida do mergulho, pois os animais emitem cliques direcionados para baixo.

As detecções de zifídeos do PMC-BS parecem corroborar com essas observações. Apesar de os encontros acústicos terem sido breves e com poucos cliques, ainda assim foi possível detectar, pelo menos, alguns cliques dos encontros acústicos registrados, que, por vezes, permitiram extrair características dos cliques importantes para classificação. No entanto, o baixo número amostral e

a falta de conhecimento das características de cliques de algumas espécies com potencial de ocorrência na região ainda são questões que precisam ser elucidadas para confirmação definitiva da espécie como baleia-bicuda-de-gervais. A baleia-bicuda-de-gervais é endêmica do Oceano Atlântico, mas os registros são mais comuns no Hemisfério Norte. Registros nas Ilhas Ascensão já indicavam que a espécie poderia ocorrer no Hemisfério Sul (MACLEOD et al., 2006). O que se conhece no Brasil é proveniente de apenas três eventos de encalhes: o primeiro e único registro no Sudeste do Brasil (em São Vicente, SP) foi em 2001, de um indivíduo de 3,90m em alto grau de decomposição (SANTOS et al., 2003). No Ceará, houve dois registros de animais mortos encalhados, um no ano de 2001 e outro mais recentemente, no ano de 2011 (MARTINS et al., 2004; LODI & BOROBIA, 2013).

Os quatro encontros acústicos sugeridos como da baleia-bicuda-de-gervais no PMC-BS foram registrados em profundidades de 1.000 - 2.000 m (média de 1.700m), sendo que dois deles ocorreram no mesmo dia, com um intervalo de cerca de 1 hora entre as detecções. Os três outros encontros, desconsiderados pela pouca quantidade de cliques detectados, foram em profundidades maiores: entre 2.000 - 2.500 m (média 2.300 m). Até o presente, no monitoramento visual, tanto embarcado como aéreo, não foi registradas nenhuma espécie de baleia-bicuda no PMC-BS. Na medida em que mais dados forem coletados, será possível fazer as primeiras observações a respeito da distribuição e uso de habitat deste grupo de cetáceos tão pouco conhecido nas águas do Brasil e da Bacia de Santos.

*Descrição e discussão sobre os cliques de *Grampus griseus**

Os encontros acústicos com golfinho-de-Risso ocorreram em seis ocasiões no PMC-BS. Em todas as ocasiões, a espécie foi identificada visualmente pela equipe de observadores. Houve outras duas avistagens em que os animais permaneceram em silêncio. Além disso, houve dois outros encontros acústicos em que o golfinho-de-Risso foi observado em associação com outras espécies e os dados não foram incluídos nas análises. Na **Tabela V.4-8**, estão sumarizados

os encontros acústicos durante as campanhas e o número de cliques extraídos.

Tabela V.4-8: *Sumários das detecções acústicas de golfinho-de-Risso (Grampus griseus) registrado no PMC-BS e o número de cliques extraídos para análise.*

Código ID MAP	Data	Profundidade (m)	No Cliques
PMC_1_A074	04/01/2016	983	19
PMC_2_A045	31/05/2016	599	189
PMC_2_A069	09/06/2016	669	306
PMC_2_A078	14/06/2016	1616	112
PMC_4_A034	20/03/2017	2197	366
PMC_5_A032	03/09/2017	449	40
Total	-	-	1032

O processamento de mais de 3.000 cliques durante os encontros acústicos mostrou uma variação de amostras com qualidades distintas. A grande variação no número de oscilações da onda acústica, desde cliques bem curtos a cliques muito longos, foi notável. Isto provavelmente está associado ao fato de os cliques sofrerem distorções quando captados de ângulos fora do eixo do animal. No PMC-BS, a geometria dos cliques detectados é desconhecida, mas, pela observação dos dados, assume-se que a maioria, se não todos os cliques, foram captados fora do eixo e com geometria variável. Muitos cliques notavelmente apresentaram um prolongamento da onda acústica, provavelmente associados a cliques fora do eixo ou reflexos da superfície. Para evitar a inclusão de cliques com muita distorção, aqueles que tiveram duração maior que 500 μ s foram desconsiderados pelas análises. No total foram incluídos 1.032 cliques.

A **Figura V.4-39** ilustra alguns exemplos de cliques, que provavelmente foram captados de diferentes eixos. É importante notar como a forma da onda entre os cliques dos exemplos diferem entre si. Cerca de apenas 10% dos cliques duraram menos que 100 μ s (típico entre os delfinídeos). A duração média foi 314 μ s. A média da frequência pico foi de 48 kHz e a frequência central 51 kHz. A largura da banda em -10 dB foi 29 kHz, em -3dB foi 12 kHz e em RMS foi 11 kHz. A média do ICI foi 215 ms. Os resultados obtidos estão sumarizados na **Tabela V.4-9**.

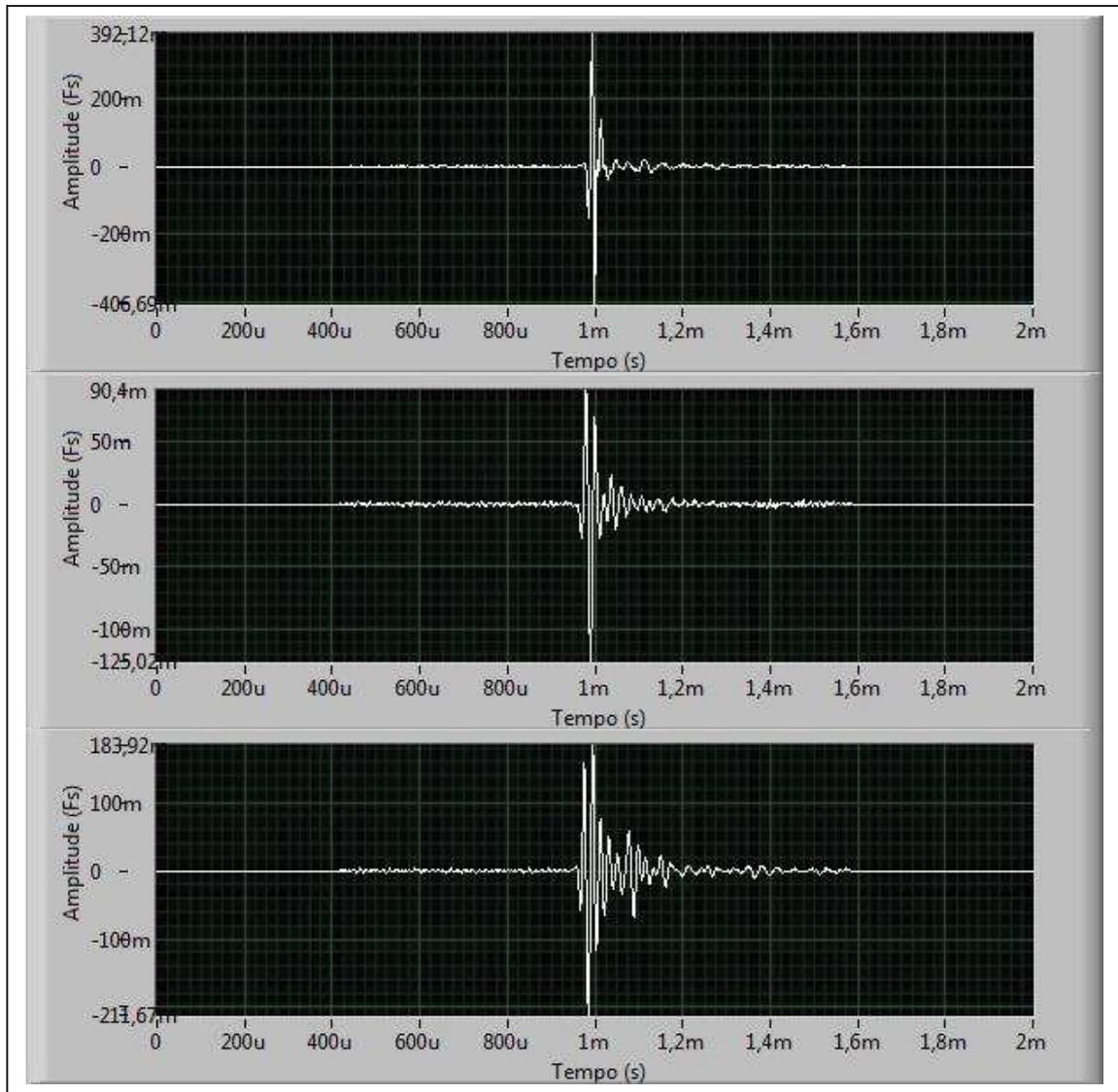


Figura V.4-39: Exemplos de cliques do golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*). Os exemplos ilustram cliques com diferentes graus de distorção, provavelmente relacionados ao fato de terem sido captados de diferentes ângulos (desconhecidos) em relação ao animal emissor.

Tabela V.4-9: Resultados das análises de cliques ($n= 837$) golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*), incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

Parâmetro	Média (min - max)	Min - Max	Desvio Padrão	CV
Frequência Pico	48,1	23 - 79	10,3	20%
Frequência Central (kHz)	50,9	33 - 74	8,1	20%
Largura da banda -3dB (kHz)	11,8	1 - 48	9,1	80%
Largura da banda -10dB (kHz)	29,1	2 - 81	11,9	40%
Largura da banda RMS (kHz)	11	0,4 - 31	4,7	40%
Duração (μ s)	314	26 - 500	10,1	40%
ICI ($n=215$)	215	(11 - 796)	168,4	78%

A média de frequência pico dos cliques foi na faixa de 50 kHz e a frequência central levemente mais alta, na faixa um pouco acima de 50 kHz. Os cliques foram de banda larga, com largura em -10dB de 29 kHz, -3dB de 12 kHz e RMS de 11 kHz e, na maioria, foram bimodais, com diversos picos secundários e vales entre os picos. Os picos secundários ocorreram na faixa entre 30 - 40 kHz ou entre 60 - 70 kHz. Por vezes, a frequência pico ficou dentro desta faixa abaixo ou acima de 50 kHz, com picos menores entre 40 – 60 kHz. O ICI variou bastante e a média foi de 215 ms. A **Figura V.4-40** apresenta exemplos do espectro de cliques e a **Figura V.4-41** o gráfico de Winger-Ville.

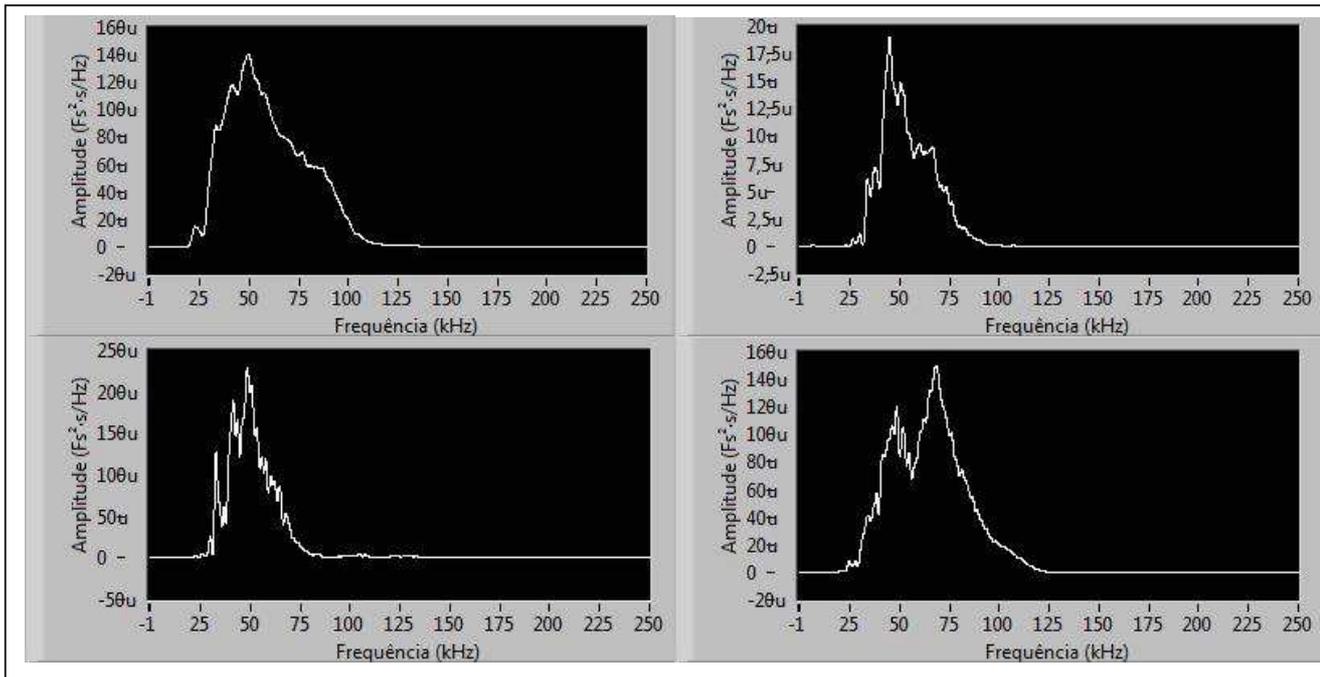


Figura V.4-40: Espectro de frequência de quatro cliques do golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*). A figura superior à direita representa um clique de duração mais curta ($> 100 \mu\text{s}$), banda mais larga e frequência pico típica (em torno de 50 kHz). Os outros cliques são de duração maior e os picos e vales são mais pronunciados. A figura inferior à esquerda mostra um clique com frequência pico mais alta do que a média (em torno de 70 kHz) e um pico secundário em 50 kHz.

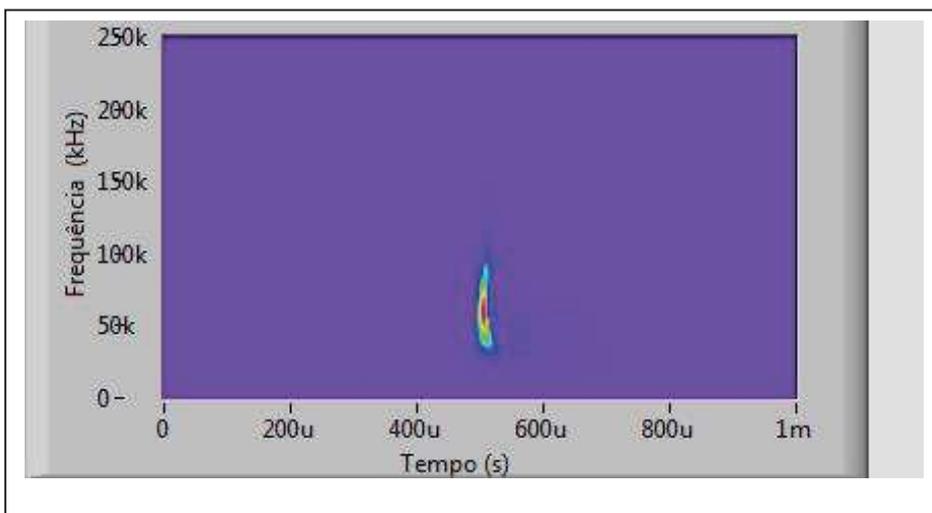


Figura V.4-41: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique do golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*). Neste exemplo, um clique típico dentre as características observadas neste estudo.

Os cliques do golfinho-de-Risso foram obtidos em seis encontros acústicos, nos quais a espécie foi confirmada visualmente. Nenhum outro cetáceo foi avistado nos arredores. Houve um encontro em que cliques de cachalote puderam ser detectados, porém eles possuem frequência pico bem mais baixa e foram facilmente distinguidos dos cliques do golfinho-de-Risso. Houve encontros com grupos desde pequenos a grandes (3 a 100 indivíduos), com duração e quantidade variável de vocalizações. Também foram realizadas duas avistagens, nas quais os animais permaneceram em silêncio. Na maior parte dos encontros, os animais não se aproximaram e foram feitas manobras com a embarcação para aproximação. Milhares de cliques foram detectados durante esses encontros e, no total, foram processados e analisados pouco mais de 1.000 cliques.

Estudos dos cliques do golfinho-de-Risso abrangeram tanto animais em cativeiro como no ambiente natural. No cativeiro, observou-se que a grande maioria dos cliques apresentava picos de frequência menor que 50 kHz (média 47,9 kHz), mas com a frequência central maior, mostrando que os cliques são bimodais com componentes em frequências mais altas (PHILIPS et al., 2003). Em ambiente natural, MADSEN et al. (2004a) observaram valores de frequência pico em torno de 45 kHz e componentes de alta frequência, que diminuíam em intensidade quando comparados aos cliques no eixo e fora do eixo. MADSEN et al. (2004a) reportaram frequência central em 78 kHz, mas com valores de 50 - 53 kHz para cliques fora do eixo (ângulos de 6° a 16°) e duração dos cliques menor que >100 µs. Em ambos os estudos, tanto em cativeiro como em ambiente natural, foram considerados apenas os cliques no eixo à frente do animal na descrição dos resultados.

Mesmo que a maioria dos cliques analisados no PMC-BS seja provavelmente fora do eixo e (proveniente de geometria desconhecidas), ainda assim os dados permitem algumas comparações com as informações da literatura. Observou-se, por exemplo, que a média das frequências de pico foi semelhante (em torno de 50 kHz), enquanto que a frequência central foi menor do que reportado na literatura. No entanto, MADSEN et al. (2004a) observaram as características de cliques fora do eixo e reportaram frequência central mais baixa e semelhante às encontradas neste estudo (50 - 55 kHz). Já a média da duração do clique foi bem maior nos

dados do PMC-BS. Cliques fora do eixo tendem a sofrer um efeito de filtro passa-baixas, e os componentes de frequência mais alta acabam sendo atenuados. Outro efeito é o aumento do número de oscilações e duração do clique (MADSEN et al., 2004a). Estas observações indicam que as características reportadas no PMC-BS são de cliques fora do eixo. Além do pico em torno de 50 kHz, também foram verificados cliques com pico em frequência maiores (máximo de 80 kHz). No geral, os cliques foram bimodais. Foram verificados picos menos acentuados em frequências tanto abaixo como acima do pico máximo em torno de 50 kHz. Os picos e vales do espectro foram mais acentuados nos cliques mais longos (presumivelmente fora do eixo). SOLDEVILLA et al. (2008) analisaram cliques de diferentes espécies, examinando em detalhes a distribuição de picos e vales no espectro e chegaram à conclusão de que o golfinho-de-Risso apresentou picos consistentes distribuídos no espectro, que permitiu diferenciá-los dos cliques de outras cinco espécies presentes na região do sul da Califórnia. Naquele estudo, SOLDEVILLA et al. (2008) utilizaram dados de gravações provenientes de hidrofones rebocados e gravadores autônomos, portanto, com a geometria de recepção dos cliques desconhecida. No futuro, análises similares podem revelar se os cliques do golfinho-de-Risso na Bacia de Santos apresentam picos e vales como observado em outras regiões (SOLDEVILLA et al., 2017).

Atualmente, os resultados obtidos no PMC-BS estão de acordo com as descrições feitas na literatura, principalmente quanto à frequência pico observada (48 kHz), sendo o restante dos parâmetros mais variáveis (provavelmente por causa dos efeitos de distorções da captação do clique fora do eixo). A caracterização de cliques do golfinho-de-Risso faz parte dos esforços para investigar as espécies da subfamília Globicephalinae, com o objetivo de verificar se existem características espécie-específicas que podem ser utilizadas na identificação desse grupo de delfínídeos.

*Descrição e discussão sobre os cliques de *Feresa attenuata**

Os encontros acústicos com a orca-pigmeia ocorreram nos dias 22/03/2017, na 4ª Campanha, e no dia 12/02/2018, na 6ª Campanha. Em ambos os encontros, a espécie foi identificada pela equipe visual e nenhuma outra espécie foi

observada nos arredores.

Na 4ª Campanha, o grupo foi avistado às 09h48min e houve manobra para aproximação. A embarcação se aproximou e permaneceu com o grupo por volta de 20 minutos. O encontro durou cerca de 25 minutos e, apesar de muitos assovios registrados, poucos cliques foram detectados e tiveram qualidade insuficiente para análise.

Na 6ª Campanha, outro grupo de orca-pigmeia foi avistado e foi feita manobra para tentativa de aproximação do grupo. Os animais estavam em um grupo de cerca de 30 indivíduos e não permitiram muita aproximação. Por vezes, o grupo se dividiu em subgrupos menores. O comportamento estava pouco ativo (nenhuma atividade aérea) e o deslocamento não seguia uma trajetória definida. A embarcação permaneceu com o grupo por cerca de 20 minutos e os animais ficaram em silêncio na maior parte do tempo. Uma única sequência longa e forte de cliques de aproximadamente 20 segundos de duração foi detectada às 12h42min. Foi possível extrair centenas de cliques de qualidade para análise. De um total de 837 cliques (exemplos na **Figura V.4-42**), todos tinham boa qualidade e foram extraídos de uma sequência de cerca de 20 segundos durante o encontro acústico PMC_6_A46.

Os resultados obtidos estão sumarizados na **Tabela V.4-10**. Os cliques da orca-pigmeia são curtos (duração média: $36 \mu s \pm 10,1$). A média da frequência pico foi 60 kHz e a frequência central 65 kHz. A largura da banda em -10 dB foi 48 kHz, 21 kHz em -3dB, e 14 kHz em RMS. A média do ICI foi 62 ms. A **Figura V.4-42** ilustra alguns exemplos de cliques, que provavelmente foram captados de diferentes eixos. O gráfico inferior na **Figura V.4-42**, por exemplo, mostra um alongamento do clique, que pode estar associado a cliques captados fora do eixo (MADSEN et al., 2004b).

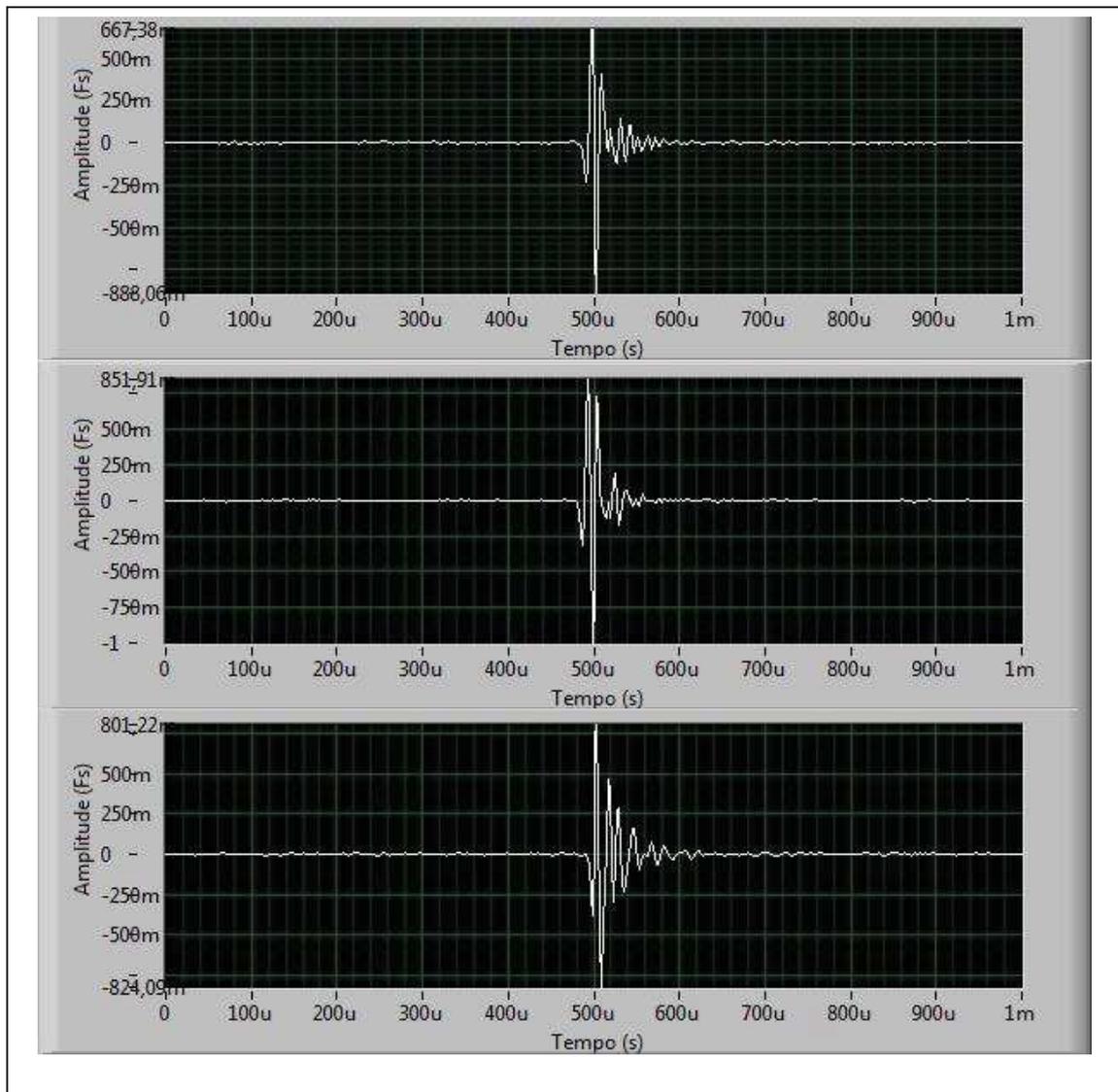


Figura V.4-42: Exemplos de cliques da orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). Os exemplos ilustram cliques com diferentes graus de distorção, provavelmente relacionados ao fato de terem sido captados de diferentes ângulos (desconhecidos) em relação ao animal emissor.

No geral, os cliques são de banda larga e os picos de frequência foram consistentes em valores nos arredores de 60 kHz. Foram observados cliques com um pico secundário, em cerca de 90 kHz, e eventualmente picos menores em 110 e 140 kHz. Também houve cliques com pico entre 60 - 90 kHz e um pico secundário em cerca de 50 kHz, ou cliques com picos entre 50 - 55 kHz e decaimento de energia sem nenhum outro pico pronunciado. A frequência central,

que representa melhor o conteúdo espectral para cliques do tipo bimodal, foi um pouco acima da frequência média, com valor de 65 kHz. A **Figura V.4-43** apresenta exemplos do espectro de cliques com diferentes picos e a **Figura V.4-44** o gráfico de Winger-Ville.

Tabela V.4-10: Resultados das análises de cliques ($n= 837$) da orca-pigmeia (*Feresa attenuata*), incluindo a média, valor mínimo (Min), valor máximo (Max), desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

Parâmetro	Média (min - max)	Min - Max	Desvio Padrão	CV
Frequência Pico	60	38 - 92	7,8	12%
Frequência Central (kHz)	65	42 - 85	5,6	9%
Largura da banda -3dB (kHz)	21	2 - 96	11,2	53%
Largura da banda -10dB (kHz)	48	20 - 117	14,2	30%
Largura da banda RMS (kHz)	14	1 - 71	6,4	45%
Duração (μ s)	36	18 - 96	10,1	28%
ICI ($n=632$)	63	(5 – 140)	21,1	34%

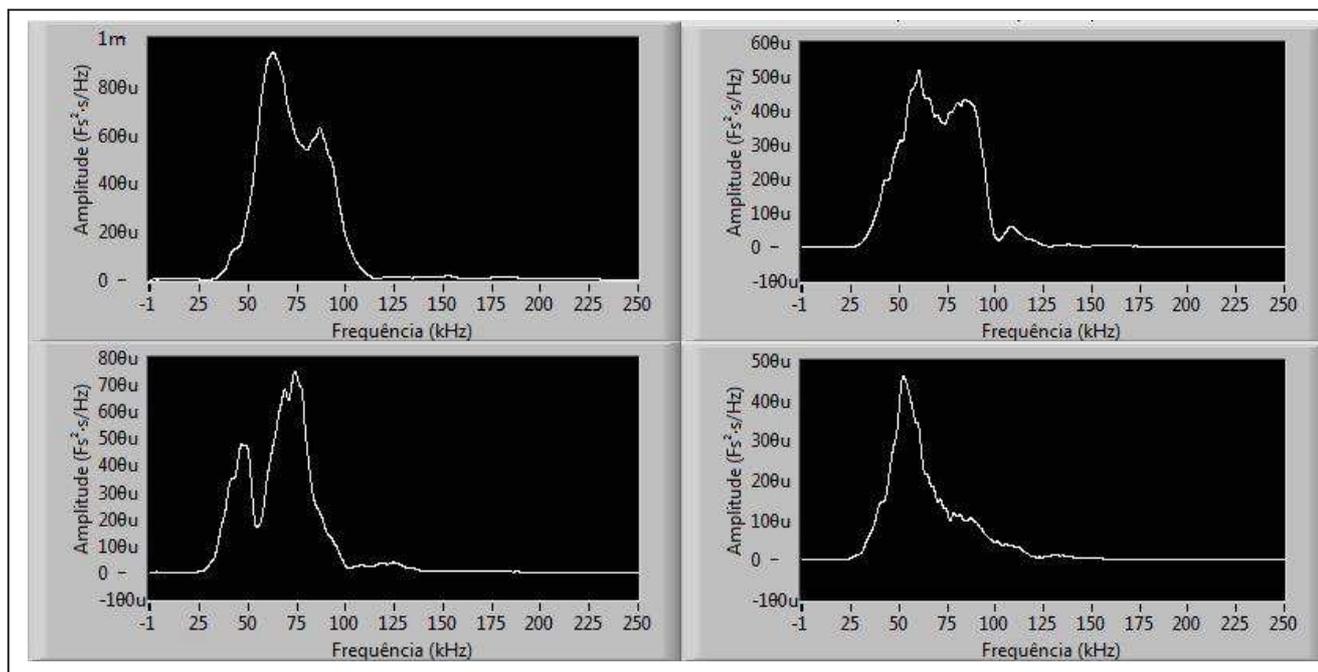


Figura V.4-43: Espectro de frequência de quatro cliques de orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). O pico de frequência máximo e os picos secundários variaram entre 50 - 90 kHz. Picos menores foram observados em cerca de 110 kHz para alguns cliques, como no da figura inferior à direita.

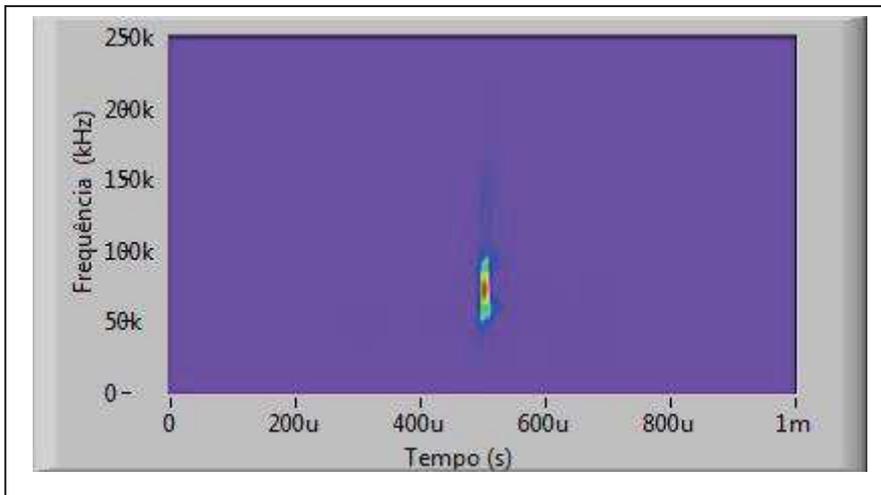


Figura V.4-44: Gráfico da distribuição de Winger-Ville de um clique da orca-pigmeia (*Feresa attenuata*). Neste exemplo, há um clique típico dentre as características observadas neste estudo. O pico de frequência em cerca de 60 kHz (cor vermelha), a banda larga (-10dB em 47 kHz) e duração curta (40 μ s).

Os cliques da orca-pigmeia foram obtidos de uma amostra coletada em um encontro com um grupo identificado pela equipe de observadores do PMC-BS. Nenhuma outra espécie foi observada nos arredores. O grupo permaneceu em deslocamento sem direção definida e sem muita atividade aérea, permanecendo em silêncio na maior parte do tempo, durante os cerca de 20 minutos de tentativas de aproximação. O grupo pareceu estar em descanso, mas não permitiu muita aproximação. Durante o encontro, sequências de cliques com boa relação sinal/ruído foram detectadas. Os cliques foram detectados por um curto espaço de tempo (cerca de 20 segundos) e logo as vocalizações cessaram ou, pelo menos, não foram mais detectadas. É possível que o grupo estivesse investigando a embarcação e/ou os hidrofones, mas logo perdeu o interesse. No entanto, apesar de breve, é possível afirmar que os cliques apresentados neste estudo são provenientes da espécie, sobre a qual muito pouco se sabe a respeito do comportamento.

O único estudo que descreve os cliques de *Feresa attenuata* foi feito por MADSEN et al. (2004b) que observaram cliques bimodais com uma frequência

pico dominante em 40 kHz; e outro pico mais variável em cerca de 100 kHz e frequência central em torno de 70 - 85 kHz. Neste estudo, o pico dominante foi mais alto (60 kHz) e os outros picos observados foram bem mais variáveis (ver **Figura V.4-43**). A largura da banda foi menor do que a reportada por MADSEN et al., (2004b). No entanto, a duração dos cliques foi muito similar, ou seja, 20 - 40 μ s em MADSEN et al. (2004b) e média de 36 μ s neste estudo. O ICI ficou (média de 62 ms) dentro da faixa reportada por MADSEN et al. (2004b) (entre 50 - 120 ms).

As diferenças observadas podem estar relacionadas ao fato de que MADSEN et al. (2004b) apresentaram em seu estudo apenas os cliques qualificados como recebidos no eixo à frente do animal, enquanto, neste estudo, foram incluídos cliques recebidos de ângulos desconhecidos, provavelmente provenientes de diferentes eixos em relação ao animal emissor. Cliques captados no eixo são mais fortes e curtos, e as bandas de frequências mais altas são mais evidentes. Já os cliques fora do eixo e os componentes de frequência mais alta tendem a ser filtrados (MADSEN et al., 2004b). Neste estudo, pouca energia foi observada acima de 100 kHz, já MADSEN et al. (2004b) reportaram picos em torno de 100kHz. Além disso, o pico em 40 kHz reportado por MADSEN et al. (2014b) não foi observado neste estudo. Os picos aqui observados foram consistentes em 60 - 90 kHz, e com médias de frequência pico e central em 60 kHz e 65 kHz, respectivamente.

A caracterização de cliques da *Feresa attenuata* é importante pela pouca informação existente e pela baixa taxa de encontro no PMC-BS. O uso destes dados em comparações com outras espécies permitirá a avaliação da possibilidade de discriminação e classificação das diferentes espécies de delfínidos.

V.4.4 Repertório acústico – assovios

Os assovios são sons tonais produzidos por membros da família Delphinidae, a mais numerosa entre os cetáceos, para importantes atividades, como contato e coesão com membros do grupo, identificação de parentesco, atordoamento de presas, dentre outras. Por toda esta plasticidade no uso, os assovios são o tipo de som mais comum produzido pelos golfinhos e também o mais estudado ao longo do tempo (STEINER, 1981; SMOLKER et al., 1993; TYACK & CLARK, 2000; JANIK & SAYIGH, 2013).

No presente item buscou-se: (a) Caracterizar os assovios de diferentes espécies/gêneros de delfínídeos; e (b) Distinguir os assovios entre as espécies/gêneros de delfínídeos de acordo com as suas características.

Seleção dos assovios para análise do ROCCA

Após o procedimento analítico da triagem dos assovios validados das campanhas, os dados acústicos para as análises multivariadas foram abertos no programa RAVEN 1.5 (Universidade de Cornell), onde cada assovio com boa qualidade (força do sinal ≥ 2) foi separado individualmente para ser analisado na extensão ROCCA (Real-time Odontocete Call Classification Algorithm) do programa PAMGUARD, especialmente desenvolvida para a análise de classificação de assovios de delfínídeos (OSWALD et al., 2003).

Previamente à análise no ROCCA-PAMGUARD, há uma seleção aleatória de amostras de assovios por meio de seleção randômica, realizada pelo programa R, onde arquivos com um N de assovios iguais ou menores que 30 são todos analisados. Quando o N amostral é de 31 a 100 assobios, são analisados 75% dos assobios através de seleção randômica ou até o máximo de 50, e, quando o N amostral é acima de 100, serão analisados 50 assobios escolhidos por seleção randômica.

A análise usando o software PAMGUARD possibilita a extração de 50 parâmetros que compõem o sinal acústico de interesse (descritos na **Tabela V.4-11**). Para uso do PAMGUARD, é necessária uma configuração específica

para ser possível atender às demandas exigidas pelo Projeto de Monitoramento de Cetáceos (PMC-BS), para posterior análise dos assovios. O próximo passo é utilizar um classificador, neste trabalho foi o “Northwest Atlantic Ocean Classifiers”, o qual possui dados preexistentes de assovios e acumula os novos dados analisados. Para extração dos parâmetros, o assovio selecionado é enquadrado através do cursor.

O PAMGUARD abre automaticamente uma janela do assovio no ROCCA. Deve-se clicar no início e fim do assovio e o programa reproduz um traço do contorno do assovio. Caso o traço não reproduza fielmente o contorno, devem-se inserir pontos manualmente no contorno do assovio, e clicar em “Classify”. O ROCCA cruzará os novos parâmetros com os que já se encontram no classificador já citado, fazendo com que o programa classifique em nível de espécie que possui modulação e parâmetros de valores similares já analisados, além de acumular os novos dados obtidos das análises dos assovios do PMC, com o nível taxonômico identificado. São geradas duas planilhas do Excel: “RoccaContourStats” e “SchoolStats” e, a partir delas, será realizada análise multivariada.

Tabela V.4-11: Descrição das variáveis acústicas medidas (50) através do algoritmo ROCCA (Real-time Odontocete Call Classification Algorithm), pacote integrante do programa PAMGUARD, para os assovios de delphinídeos na Bacia de Santos.

Abreviação	Descrição da variável
FREQBEGSWEEP	Inclinação do alcance inicial (1 = positiva, -1 = negativa, 0 = zero)
FREQBEGUP	Variável binária: 1= Variável binária: 1=inclinação inicial é positiva, 0=inclinação inicial é negativa
FREQBEGDWN	Variável binária: 1= Variável binária: 1=inclinação inicial é negativa, 0=inclinação inicial é positiva
FREQENDSWEEP	Inclinação do alcance final (1 = positiva, -1 = negativa, 0 = zero)
FREQENDUP	Variável binária: 1= Variável binária: 1=inclinação final é positiva, 0=inclinação final é negativa
FREQENDDWN	Variável binária: 1= Variável binária: 1=inclinação final é negativa, 0=inclinação final é positiva
FREQBEG	Frequência inicial (Hz)
FREQEND	Frequência final (Hz)
FREQMIN	Frequência mínima (Hz)
DURATION	Duração (seg)
FREQRANGE	Frequência máxima – Frequência inicial (Hz)
FREQMAX	Frequência máxima (Hz)
FREQMEAN	Frequência média (Hz)
FREQMEDIAN	Frequência mediana (Hz)
FREQSTDDEV	Desvio padrão da frequência (Hz)
FREQSPREAD	Diferença entre os percentis de frequência em 75% e 25%
FREQQUARTER1	Frequência em ¼ da duração (Hz)
FREQQUARTER2	Frequência na metade da duração (Hz)
FREQQUARTER3	Frequência em ¾ da duração (Hz)
FREQCENTER	$(\text{Frequência mínima} + (\text{frequência máxima} - \text{frequência mínima}))/2$
FREQRELBW	Largura de banda relativa: $(\text{freq. máx} - \text{freq. mín})/\text{freq. central}$

Abreviação	Descrição da variável
FREQMAXMINRATIO	Freq. máx/freq. mín
FREQBEGENDRATIO	Freq. inicial/freq. final
FREQCOFM	Coeficiente da modulação de frequência: faça 20 medições de frequência igualmente espaçadas no tempo e subtraia cada valor de frequência do anterior. COMF é a soma dos valores absolutos dessas diferenças, todas divididas por 10.000.
FREQNUMSTEPS	Número de degraus (10% ou mais do aumento ou diminuição da frequência em dois pontos de contorno)
NUMINFLECTIONS	Número de pontos de inflexão (mudança na inclinação de positivo para negativo ou negativo para positivo)
INFMAXDELTA	Tempo máximo entre dois pontos de inflexão
INFLMINDELTA	Tempo mínimo entre dois pontos de inflexão
INFLMAXMINDELTA	Delta máx/delta mín
INFLMEANDELTA	Tempo médio entre pontos de inflexão
INFLSTDDEVDELTA	Desvio padrão do tempo entre pontos de inflexão
INFLMEDIANDELTA	Mediana do tempo entre pontos de inflexão
FREQSLOPEMEAN	Média total da inclinação
FREQPOSSLOPEMEAN	Média da inclinação positiva
FREQNEGSLOPEMEAN	Média da inclinação negativa
FREQABSSLOPEMEAN	Média absoluta da inclinação
FREQSLOPERATIO	Inclinação positiva/média da inclinação negativa
FREQSWEEPUPPERCENT	Percentual dos assovios que possuem inclinação positiva
FREQSWEEPDOWNPERCENT	Percentual dos assovios que possuem inclinação negativa
FREQSWEEPFLATPERCENT	Percentual dos assovios que possuem inclinação zero
NUMSWEEPUPDOWN	Número de pontos de inflexão que vão de inclinação positiva para inclinação negativa
NUMSWEEPDOWNUP	Número de pontos de inflexão que vão de inclinação negativa para inclinação positiva
NUMSWEEPUPFLAT	Número de vezes que a inclinação muda de

Abreviação	Descrição da variável
	positiva para zero
NUMSWEEPDOWNFLAT	Número de vezes que a inclinação muda de negativa para zero
NUMSWEEPFLATDOWN	Número de vezes que a inclinação muda de zero para negativa
NUMSWEEPFLATUP	Número de vezes que a inclinação muda de zero para positiva
FREQSTEPUP	Número de degraus que possuem frequência crescente
FREQSTEPDOWN	Número de degraus que possuem frequência decrescente
STEPDUR	Número de degraus/duração
INFLDUR	Número de pontos de inflexão/duração

Análise estatística dos dados

Para investigar a importância dos 50 descritores do ROCCA em descrever a diferença dos assovios entre os táxons, utilizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA). Esta é uma técnica multivariada de ordenação que reduz a multidimensionalidade dos dados por meio de um conjunto de eixos (autovetores), que são calculados a partir de uma matriz de correlação. Dada a diferença de escalas entre algumas variáveis, os dados foram standardizados antes de rodar a análise.

Além da análise multivariada exploratória (PCA), a colinearidade (correlação entre variáveis) foi avaliada por meio do índice de correlação de Pearson. Este índice varia de -1 (correlação negativa total entre as duas variáveis) a +1 (correlação positiva total), sendo igual a 0 quando não existe nenhuma correlação. Variáveis com índices maiores que 0,7 ou menores que -0,7 foram consideradas altamente correlacionadas e somente uma delas foi considerada para as análises multivariadas de classificação descritas abaixo. Esse procedimento é necessário, pois uma das premissas da DFA é a ausência de colinearidade (correlação entre variáveis descritoras).

Para a classificação dos assovios em espécies, foi feita uma Análise

Discriminante (DFA). De forma similar à PCA, uma DFA irá ajustar um eixo na direção de maior variabilidade entre grupos. Estes modelos irão achar combinações lineares de descritores que maximizam a diferença entre os grupos (VALENTIN, 2000). Os modelos foram avaliados através de uma matriz de confusão, que mostra as classificações de espécie preditas pelo modelo.

Outro modelo utilizado para classificação dos assovios foram as Árvores de Classificação e Regressão (CART). Este modelo separa os dados através de bifurcações binárias (nó). Cada nó é baseado num valor de determinada variável. A vantagem desta técnica é que a mesma não é paramétrica. Esta técnica foi utilizada de maneira exploratória neste relatório usando o pacote 'rpart' (THERNEAU & ATKINSON, 2018).

Descrição dos assovios de delfínídeos

O banco de dados para a descrição e classificação de assovios de delfínídeos foi composto de 1.759 assovios de 10 espécies/gêneros de delfínídeos (**Tabela V.4-12**). A espécie melhor amostrada foi o golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*), com 45% dos assovios analisados. Outras espécies foram bem amostradas, com mais de 100 assovios registrados cada, como o golfinho-rotador (*S. longirostris*), golfinho-de-Clymene (*S. clymene*) e golfinho-nariz-de-garrafa da subespécie oceânica (*Tursiops truncatus truncatus*). Outras espécies/gêneros foram gravadas em uma única ou poucas ocasiões (encontros) ou possuíam poucos assovios considerados na amostra (menos que 50 assovios), como o golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*), orca-pigméia (*Feresa attenuata*), e gêneros como *Globicephala* (baleias-piloto) e *Delphinus* (golfinhos-comuns). Por esses motivos, as quatro espécies/gêneros foram excluídas das análises de classificação dos assovios.

Tabela V.4-12: *Espécies/gêneros de delfínídeos amostradas e número de encontros com registros de assovios na Bacia de Santos, ordenada pelas espécies com maior número de amostras.*

Espécie/gênero	n° encontros	n° assovios
<i>Stenella frontalis</i>	43 (58,9%)	791 (45,0%)
<i>Stenella longirostris</i>	8 (11,0%)	382 (21,7%)
<i>Tursiops truncatus</i>	5 (11,6%)	159 (9,0%)
<i>Stenella clymene</i>	3 (4,1%)	115 (6,5%)
<i>Steno bredanensis</i>	2 (2,7%)	86 (4,9%)
<i>Stenella attenuata</i>	5 (6,8%)	72 (4,1%)
<i>Grampus griseus</i>	1 (1,3%)	50 (2,8%)
<i>Feresa attenuata</i>	1 (1,3%)	50 (2,8%)
<i>Delphinus</i>	2 (2,7%)	35 (1,9%)
<i>Globicephala</i>	3 (4,1%)	19 (1,1%)
Total	73	1.759

Análise exploratória da diferenciação do repertório entre gêneros e espécies

Os cinco primeiros eixos do PCA explicaram 60% da variância dos dados (Tabela V.4-13), sendo que o primeiro eixo explicou 17,2% da variância, o segundo eixo explicou 15,1% e o terceiro explicou 12,5%. Pegando-se a principal variável que descreve a variância de cada um dos 7 primeiros eixos, que descrevem mais de 70% da variância dos dados, tem-se as seguintes variáveis mais importantes: frequência máxima (FREQMAX); percentual do assovio que tinha uma inclinação positiva ou ascendente (FREQSWEETUPPERCENT); frequência mínima (FREQMIN); valor médio absoluto da inclinação (FREQABSSLOPEMEAN); inclinação do final do assovio (FREQENDSWEET); inclinação do início do assovio (FREQBEGSWEET); e número de degraus (FREQNUMSTEPS).

Tabela V.4-13: Proporção da variância explicada dos assovios de delphinídeos da Bacia de Santos pelos primeiros eixos da Análise de Componentes Principais (PCA). Variáveis mais importantes de cada eixo foram definidas arbitrariamente como as que possuíam autovetor maior que 0,3 ou menor que -0,3.

Eixo	Desvio padrão	Proporção da variância	Prop. variância acumulada	Variáveis mais importantes
1	2,93	0,17	0,17	FREQMAX
2	2,75	0,15	0,32	FREQSWEEPUPPERPERCENT
3	2,50	0,13	0,45	FREQMIN
4	2,07	0,09	0,53	FREQABSSLOPEMEAN, FREQSWEEPFLATPERCENT
5	1,87	0,07	0,60	FREQENDSWEEP
6	1,73	0,06	0,66	FREQBEGSWEEP, FREQBEGDWN, FREQBEGUP
7	1,58	0,05	0,71	FREQNUMSTEPS, STEPDUR, FREQSTEPUP

A Análise de Componentes Principais (PCA) evidenciou que os gêneros apresentam sobreposição de características dos assovios (**Figura V.4-45**). Alguns gêneros tenderam a se diferenciar mais dos demais, conforme as elipses normais de 95% de probabilidade plotadas para cada grupo. Os gêneros *Globicephala* e *Steno* apresentaram elipses com grande sobreposição e deslocadas à esquerda do eixo principal, sugerindo que os assovios desses dois grupos sejam distintos dos demais gêneros. *Tursiops* foi o gênero que apresentou maior variabilidade, conforme sugere a elipse de 95% de probabilidade.

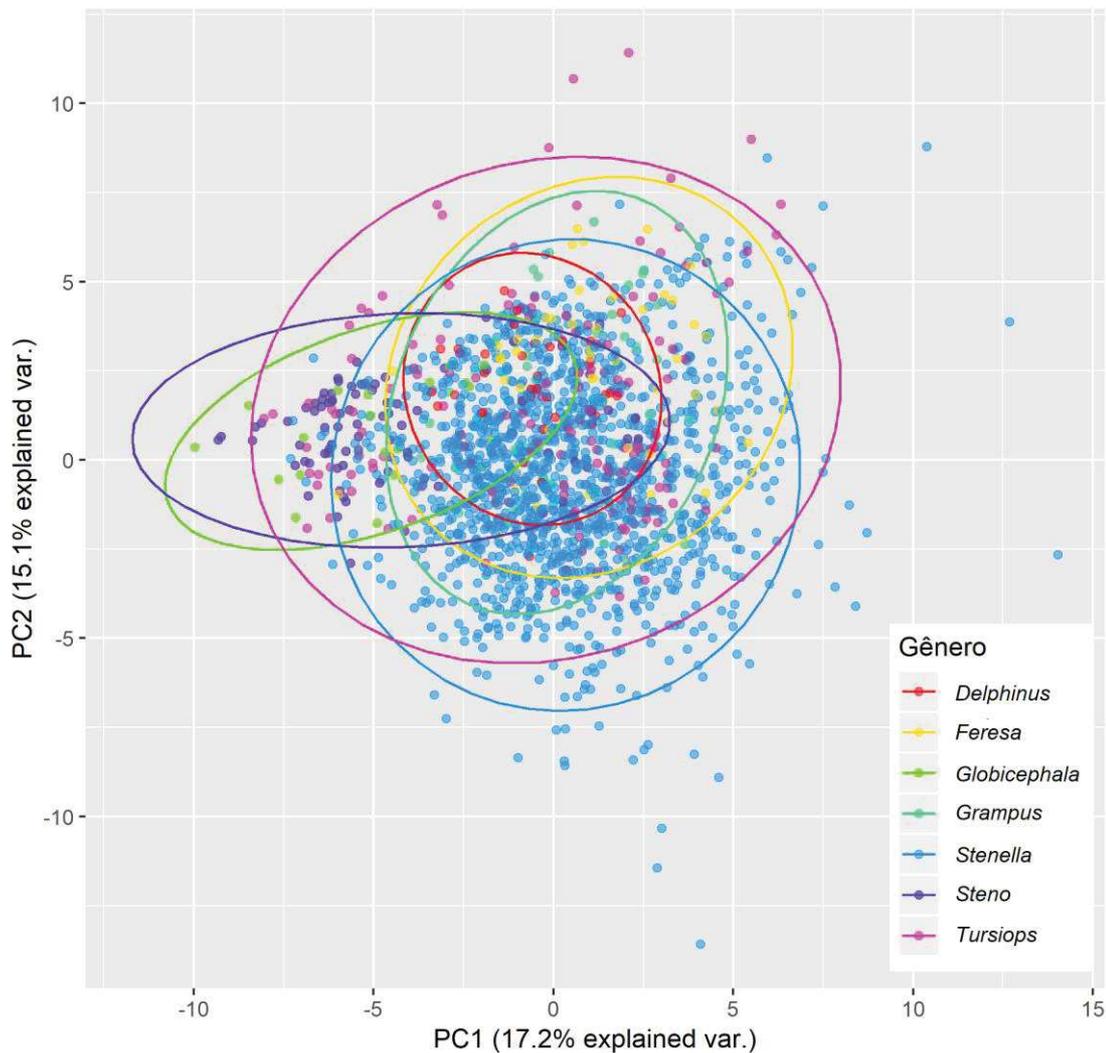


Figura V.4-45: Biplot com os dois primeiros eixos fatoriais da Análise de Componentes Principais (PCA) das características dos assovios de diferentes gêneros de delfínídeos da Bacia de Santos. Elipses normais para cada grupo com 95% de probabilidade.

Correlação entre variáveis descritivas dos assovios

Por meio da matriz de correlação entre as variáveis descritivas pelo ROCCA, é possível observar uma grande correlação entre algumas variáveis consideradas (**Figura V.4-46**). Algumas variáveis com índice de correlação maior que 0,7 ou menor que -0,7 foram excluídas das análises de classificação multivariada dos parâmetros acústicos (DFA e CART). As variáveis de frequência mínima e

máxima estavam correlacionadas com outras, como variação da frequência (FREQRANGE), frequência média (FREQMEAN), desvio padrão da frequência (FREQSTDDEV) e frequência central (FREQCENTER). A duração do assvio estava correlacionada com quatro variáveis relacionadas com inflexões (INFLMAXDELTA, INFLMEANDELTA, INFLSTDDEVDELTA e INFLMEDIANDELTA). Além das oito variáveis citadas, outras 17 variáveis também estavam correlacionadas com alguma outra variável. Assim, a análise de correlação identificou pelo menos 25 variáveis redundantes e 25 variáveis não correlacionadas com outras, que puderam ser usadas na Análise Discriminante (DFA) e na Árvore de Classificação (CART).

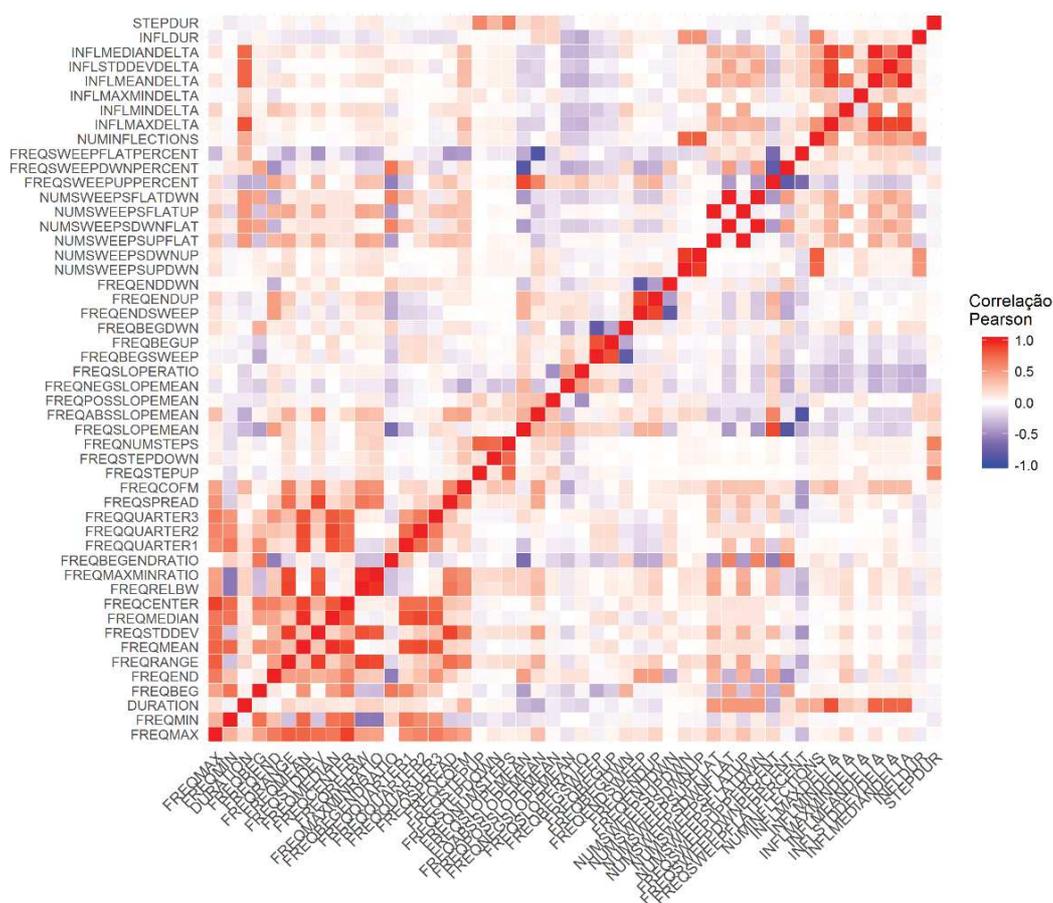


Figura V.4-46: Matriz de correlação das variáveis descritivas dos assvios de delfinídeos da Bacia de Santos pelo ROCCA. Ver abreviações e descrição das variáveis na Tabela V.4-11.

Classificação de assovios de delfínídeos

Após a filtragem, que eliminou as espécies com amostra pequena (menos de 50 assovios) e baixa representatividade (somente um encontro com registro bioacústico), restaram seis espécies de delfínídeos que foram usados nas análises. As espécies com as maiores amostras de assovios foram subamostradas de maneira aleatória para um máximo de 150 assovios, evitando assim possíveis vieses de diferentes tamanhos amostrais.

Foram considerados quatro classificadores de caráter multivariado baseados nas abordagens de Análise Discriminante (DFA) e Árvores de Classificação (CART) (**Tabela V.4-14**): (a) *DFA com variáveis indicadas pelo PCA*: considerou as principais variáveis indicadas pelos primeiros mais explicativos da PCA; (b) *DFA com variáveis indicadas pela literatura*: baseado nos descritores usados por OSWALD et al. (2003) e AZZOLIN et al. (2014); (c) *CART com variáveis indicadas pelo PCA*; e (d) *CART com variáveis indicadas pela literatura*.

De uma maneira geral, a Árvore de Classificação (CART) foi o método mais efetivo em classificar a espécie dos assovios corretamente, com aproximadamente 56 e 60% de classificações corretas. O sucesso de classificação também foi diferente entre as espécies (**Tabela V.4-15**). As espécies com maior n-amostral tenderam a ser classificadas com maior sucesso, como *Stenella longirostris*, *S. frontalis* e *Tursiops truncatus*, todas com mais de 60% de classificações acertadas, todas com 150 assovios (depois de terem seu n-total subamostrados). A Árvore de Classificação (CART) dos assovios de delfínídeos na Bacia de Santos está representada na **Figura V.4-47**.

Tabela V.4-14: Classificadores dos assovios considerados para identificação da espécie de delphinídeo na Bacia de Santos. * Modelo com maior percentual de acertos em *itálico*.

Classificadores	Variáveis	Percentual de classificações certas
DFA com variáveis identificadas pelo PCA	FREQMAX, FREQSWEETUPPERCENT, FREQMIN,	40,6%
<i>CART com variáveis identificadas pelo PCA*</i>	FREQABSSLOPEMEAN, FREQENDSWEET, FREQBEGSWEET, FREQNUMSTEPS	<i>60,2%*</i>
DFA com variáveis descritas na literatura	FREQBEG, FREQEND, FREQMEDIAN, FREQMAX,	49,2%
CART com variáveis descritas na literatura	FREQMIN, DURATION, FREQNUMSTEPS, NUMINFLECTIONS	56,4%

Tabela V.4-15: Matriz de confusão das classificações dos assovios pela espécie de delphinídeos da Bacia de Santos segundo o CART com variáveis identificadas pela PCA. Diagonal (em **negrito**) representa o número e percentual de classificações acertadas da espécie pelo modelo.

Espécie predita	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Stenella clymene</i>	<i>Steno bredanensis</i>	<i>Stenella longirostris</i>	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>Stenella frontalis</i>
<i>Stenella attenuata</i>	22 (30,6%)	3	0	1	0	4
<i>Stenella clymene</i>	5	61 (53,0%)	4	9	10	17
<i>Steno bredanensis</i>	0	0	51 (53,1%)	0	5	4
<i>Stenella longirostris</i>	1	19	4	108 (72%)	25	17
<i>Tursiops truncatus</i>	7	9	14	16	92 (61,3%)	7
<i>Stenella frontalis</i>	37	23	13	16	18	101 (67,3)
Total de Assovios	72	115	96	150	150	150

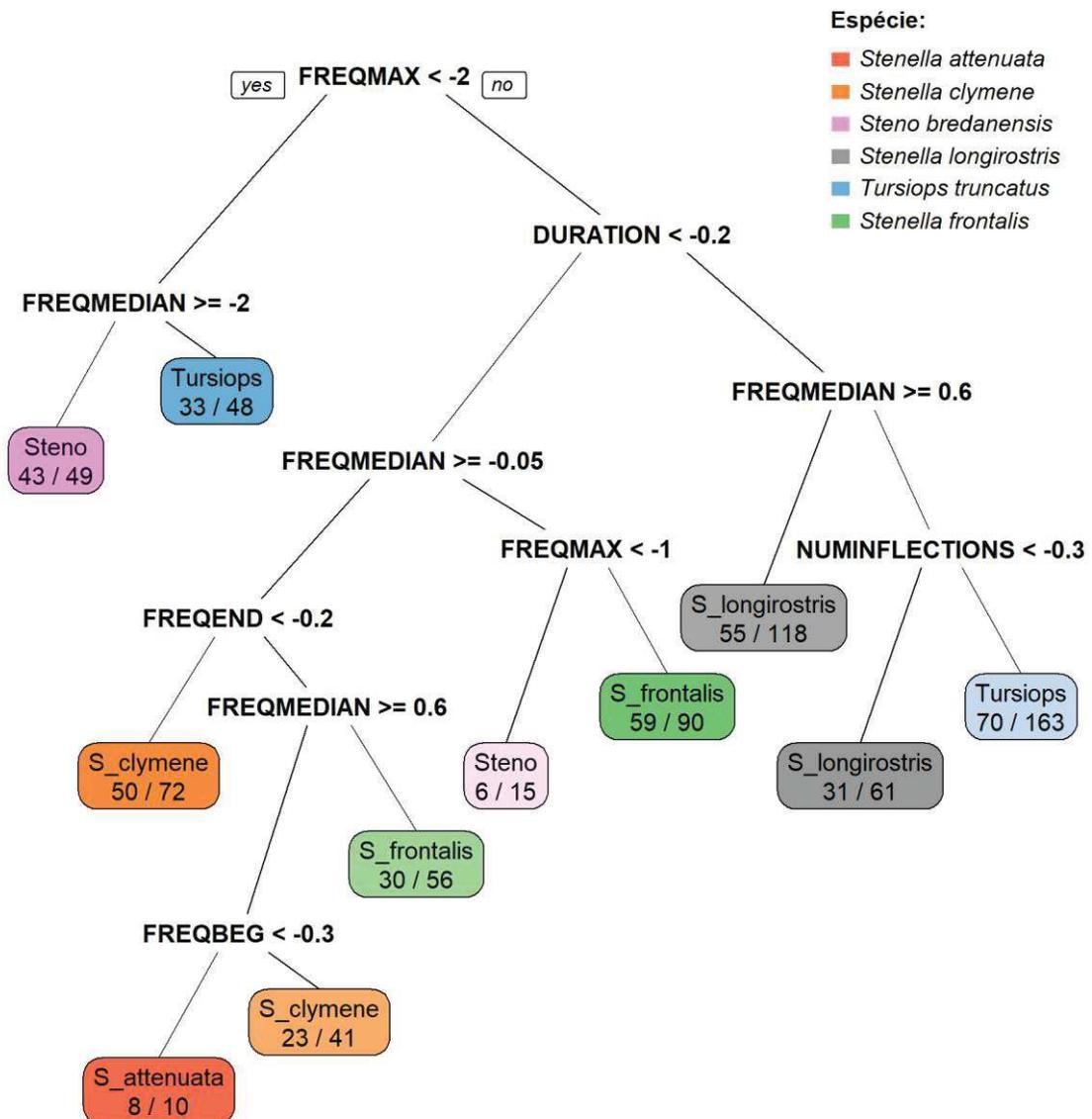


Figura V.4-47: *Árvore de Classificação (CART) dos assovios de delphinídeos na Bacia de Santos, segundo o modelo com variáveis similares à literatura. Números fracionados ao lado da variável acústica (ex: FREQMAX > -2) representam características que direcionam a espécie para ramos de classificação distintos, configurando-a; números dentro dos retângulos e abaixo do nome de gênero/espécie (ex: Tursiops 33/48): o número esquerdo representa o valor previsto (média de todos os subramos) enquanto o número direito seria a porcentagem deste resultado de decisões do valor utilizado na amostra.*

Discussão sobre assovios

Os resultados de três anos de Monitoramento Acústico Passivo do PMC-BS vêm colaborando para o aumento do conhecimento da identificação, ocorrência, distribuição, riqueza e uso de habitat da comunidade de cetáceos da Bacia de Santos. Este conhecimento vem sendo alcançado através da aplicação de análises exploratórias sobre a classificação de assovios das diferentes espécies da família Delphinidae, estudando a eficiência de sua detecção na Bacia de Santos e consolidando o estabelecimento de uma Sonoteca, ou bando de dados acústicos, que contenha a descrição dos sinais acústicos das espécies registradas.

Ao longo do período de estudo, foram testados quatro diferentes classificadores de assovios, aumentando a probabilidade de acerto conjuntamente com o aumento amostral, alcançando valores de 70% para algumas espécies, como *S. longirostris*. Este aumento na capacidade de identificação das espécies está relacionado ao resultado conjunto de seu número de avistagens e da quantidade de sinais acústicos registrados durante uma detecção. Por outro lado, os resultados também indicaram que a maioria das espécies ainda demonstra baixos valores amostrais (poucos assovios), como *S. attenuata*, além de uma baixa representatividade dos assovios, com muitas espécies/gêneros sendo gravadas em poucas ocasiões.

Apesar de eliminar espécies pouco amostradas ou representadas, ainda assim, foi possível verificar um maior sucesso dos classificadores para espécies bem amostradas. Com o aumento do número amostral, há uma tendência em melhorar a representatividade geográfica e individual das espécies, melhorando a eficiência dos classificadores.

A relação entre suficiência amostral e performance de classificação vem sendo bem discutida em outros monitoramentos no mundo. OSWALD et al. (2016) afirmam que amostras pequenas não permitem uma avaliação de performance e que seria prioritária a obtenção de dados acústicos visualmente validados para diferentes espécies de golfinhos. Estes autores afirmam a complementaridade das técnicas visuais e acústicas quando utilizadas para a detecção de espécies de forma combinada em plataforma embarcada.

Os cinco primeiros eixos da análise do PCA explicaram 60% da variância dos dados, considerando a frequência máxima e inclinação positiva ou ascendente como variáveis mais importantes, pois descrevem mais de 70% da variância dos dados. Aspectos morfométricos, como o tamanho de corpo, são tradicionalmente atribuídos a um direcionamento de uso acústico do sinal para diferentes espécies de golfinhos (STEINER, 1981; DING et al., 1995; MATTHEWS et al., 1999; RENDELL et al., 1999). Nesse sentido, a importância da frequência máxima, explicando 70% da variância dos dados, pode estar relacionada com a diferença do tamanho do corpo, principalmente entre espécies menores, como no gênero *Stenella*, e outras maiores, como em *Tursiops* e *Steno*.

Sobre os parâmetros de inclinação, sua importância nos resultados pode ser devido à predominância de assovios ascendentes no repertório de membros da família Delphinidae, apresentando relação ecológica e evolutiva com o tipo de sinal mais eficiente para curta distância em animais gregários que se comunicam no ambiente marinho. Dessa forma, esses sinais caracterizam-se por serem curtos e, em grande parte, ascendentes.

Aspectos filogenéticos e evolutivos dos assobios e suas características nos odontocetos são bem discutidos em MAY COLLADO et al. (2007) e OSWALD et al. (2008). Como a evolução de um sinal acústico demonstra sua eficácia de uso no ambiente em que se propaga (RICHARDSON et al., 1995; MERCADO & FRAZER, 1999; BRUMM, 2013), alguns fatores ecológicos podem influenciar na utilização de assobios no ambiente marinho, como o hábito gregário e a fuga de predadores. O uso de sinais de alta frequência pode possibilitar aos animais se comunicarem em distâncias bem próximas, evitando a detecção por predadores (TYACK & CLARK, 2000).

Quanto a tamanho de grupo, os assovios possuem características de frequência que são dependentes de qualidades direcionais, e isso pode oferecer uma orientação quanto à direção e localização de movimentos dos golfinhos que estão assoviando (LAMMERS & AU, 2003). OSWALD et al. (2008) mencionam algumas hipóteses, tais como evitar predadores, tamanho e composição de grupo, comportamento, variação temporal e diferenças anatômicas como influenciadoras para a eficiência deste tipo de sinal acústico no ambiente marinho.

Com o aumento da base de dados nos próximos anos, será possível testar algumas questões como estas relações ecológicas dentro da Bacia de Santos.

O presente conjunto de dados da sonoteca do PMC-BS constitui a base das análises apresentadas nestes três anos. A amostragem temporal necessária para o estudo dos cetáceos apresenta um crescimento em eficiência ao longo dos anos, conforme discutido em aspectos como a suficiência amostral. Espera-se incluir novas espécies e gêneros ao longo dos próximos anos na Sonoteca com a coleta de mais dados e inclusão de outros bancos de dados coletados por diferentes instituições.

Através da consolidação da Sonoteca, pode-se descrever o repertório acústico de diferentes espécies de cetáceos da Bacia de Santos. Atualmente, entre os 15 táxons que compõem a Sonoteca, somente no terceiro ano algumas espécies com baixo número amostral puderam aumentar consideravelmente o número de assovios catalogados, como o golfinho-comum (*Delphinus* sp.) e o golfinho-de-Clymene (*Stenella clymene*).

V.5 Estado de Saúde e Grau de Contaminação

V.5.1 Estado de saúde por meio de análise de lesões de pele

Ao longo de todas as etapas de triagem, catalogação e processamento, sempre que uma lesão epidérmica ou mutilações eram identificadas, o registro fotográfico foi copiado para pastas individualizadas por espécie. Como a presença de lesões era uma coluna da matriz de dados, a ocorrência desses registros pode ser facilmente quantificada por espécie. A **Tabela V.5-1** apresenta a prevalência (%) de lesões (e mutilações) entre os indivíduos identificados. No entanto, essa informação ainda deve ser interpretada com cautela, em especial para espécies pouco registradas, pois, com o aumento do número de indivíduos identificados, tende-se a reduzir a prevalência de lesões.

Essas lesões foram separadas de acordo com as seguintes categorias (adaptadas de WILSON et al., 1999): a) nódulos multifocais (elevações que podem ser focais ou multifocais à linha de epiderme); b) lesões semelhantes a poxvírus (lesões bem delimitadas, de halo de coloração enegrecido, e centro de coloração esbranquiçado ou enegrecido, dependendo do estágio da doença); c) ferida aberta (feridas não cicatrizadas encontradas em pele, podendo atingir camadas mais profundas da pele ou até musculatura); d) cicatriz esbranquiçada (áreas esbranquiçadas densas bem delimitadas); e) deformidades físicas (malformação congênita devido à perfeita adaptação a essa condição, avaliada pelo escore corporal do animal em questão.); f) mutilações ou interação antrópica (cortes bem delimitados em nadadeira dorsal que tenham retirado parte significativa da nadadeira, cortes paralelos em pedúnculo ou dorso com distância simétrica compatível com colisões com embarcações); g) celulite (lesões em relevo negativo, não ulceradas, bem delimitadas, multifocais ou focais); h) lesões inespecíficas. A ocorrência de cada tipo de lesão, por espécie, encontra-se na **Tabela V.5-2**.

Analisando a prevalência para aquelas espécies com maior número de registros identificados, destaca-se *Balaenoptera brydei* entre os mysticetos com mais da metade dos registros (57%) com algum tipo de lesão. Para odontocetos,

olhando para as espécies com maior quantidade de registro, nota-se uma baixa prevalência de lesões, variando de 3% em *Stenella frontalis* a 9% em *Stenella longirostris* e 13% em *Tursiops truncatus* (Tabela V.5-1).

As lesões mais frequentes entre espécies foram: ferida aberta (ocorrendo em 75% das espécies), nódulos multifocais (ocorrendo em 67% das espécies), cicatriz esbranquiçada (54% das espécies) e lesão semelhante a poxvírus (ocorrendo em 50% das espécies). As lesões do tipo celulite foram encontradas apenas em cetáceos de maior porte, em 71% das espécies de mysticetos e em *Orcinus orca*. As espécies registradas com mais tipos de lesões foram *Balaenoptera borealis*, *B. brydei*, *Megaptera novaeangliae* e *Stenella frontalis* (5 tipos de lesões). Três espécies não tiveram registro de nenhum tipo de lesão, no entanto, duas delas (*Pseudorca crassidens* e *Pontoporia blainvillei*) foram registradas em apenas uma campanha, enquanto a terceira, *B. acutorostrata*, ocorreu em quatro campanhas. Deformidades físicas foram registradas apenas para *B. borealis* e *S. frontalis*. Lesões de provável origem antrópica - mutilações, emalhe em rede e colisões - foram observadas em 8 espécies: *B. brydei*, *Grampus griseus*, *M. novaeangliae*, *Sotalia guianensis*, *S. attenuata*, *S. frontalis*, *S. longirostris* e *Tursiops truncatus*.

Tabela V.5-1: Prevalência acumulada de lesões epidérmicas (ou mutilações) entre os indivíduos identificados, por espécie e ciclo.

Ciclo	1º	2º	3º	4º	5º	6º
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	0	0	0	0	66%	66%
<i>Balaenoptera borealis</i>	0	23%	23%	23%	12%	12%
<i>Balaenoptera brydei</i>	60%	50%	55%	43%	52%	57%
<i>Balaenoptera musculus</i>	0	0	0	0	50%	50%
<i>Balaenoptera physalus</i>	0	28%	42%	56%	15%	15%
<i>Delphinus sp.</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Feresa attenuata</i>	0	0	0	0	100%	12%
<i>Globicephala sp.</i>	0	0	22%	22%	22%	22%
<i>Grampus griseus</i>	0	5%	5%	3%	3%	11%
<i>Lagenodelphis hosei</i>	0	0	0	0	0	0

Ciclo	1º	2º	3º	4º	5º	6º
<i>Megaptera novaengliae</i>	0	0	0	0	5%	5%
<i>Orcinus orca</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Peponocephala electra</i>	0	0	0	0	0	18%
<i>Physeter macrocephalus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudorca crassidens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Sotalia guianensis</i>	16%	16%	16%	16%	14%	14%
<i>Stenella attenuata</i>	50%	25%	25%	25%	20%	25%
<i>Stenella clymene</i>	0	0	0	0	11%	21%
<i>Stenella frontalis</i>	50%	6%	3%	5%	3%	3%
<i>Stenella longirostris</i>	0	10%	10%	10%	7%	9%
<i>Steno bredanensis</i>	0	0	0	0	0	4%
<i>Tursiops truncatus</i>	15%	13%	13%	11%	10%	13%

Tabela V.5-2: Ocorrência de cada tipo de lesão epidérmica por espécies (nm – nódulos multifocais; fa – ferida aberta; cel – celulite; ce – cicatriz esbranquiçada; df – deformidades físicas (malformação); pox – lesões semelhantes a poxvírus; mut – mutilações; in – inespecífica).

Tipo de lesão	nm	fa	cel	ce	df	pox	mut	in	Total
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	3
<i>Balaenoptera borealis</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	4
<i>Balaenoptera brydei</i>	0	1	1	1	0	1	1	1	5
<i>Balaenoptera musculus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Balaenoptera physalus</i>	1	1	1	1	0	1	0	1	6
<i>Delphinus sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Feresa attenuata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Globicephala sp.</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Grampus griseus</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>Lagenodelphis hosei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megaptera novaeangliae</i>	0	1	0	1	0	1	0	1	4
<i>Orcinus orca</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Peponocephala electra</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	3
<i>Physeter macrocephalus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	2

Tipo de lesão	nm	fa	cel	ce	df	pox	mut	in	Total
<i>Pontoporia blainvillei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudorca crassidens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sotalia guianensis</i>	0	0	0	1	0	0	1	1	3
<i>Stenella attenuata</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Stenella clymene</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	3
<i>Stenella frontalis</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	6
<i>Stenella longirostris</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Steno bredanensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tursiops truncatus</i>	0	1	0	1	0	0	1	1	4
Total	5	14	4	10	2	1	5	10	51

As **Figura V.5-1** a **Figura V.5-21** apresentam alguns exemplos de lesões e suas descrições mais comuns ocorrentes ao longo do PMC-BS. No geral, as lesões observadas são de etiologia desconhecida, mas dois casos observados em regiões costeiras se destacam: uma *B. brydei* atropelada por uma embarcação bimotor com grandes cicatrizes de hélice no dorso (**Figura V.5-1**); e um *T. truncatus* com a nadadeira dorsal parcialmente cortada em processo de mutilação por um fio de nylon ainda preso no animal, resultado de uma interação com aparato de pesca (**Figura V.5-2**). Lesões de mutilação foram observadas esparsamente em algumas outras espécies como em *Sotalia guianensis* e *Stenella frontalis*, porém sem causa determinada. O acompanhamento da prevalência dessas lesões permitirá inferir sobre interações interespecíficas diretas, como emalhamentos em redes de pesca ou colisões com embarcação. No total, 13 registros de mutilação por interação antrópica foram observados desde o início do monitoramento (em *Balaenoptera brydei* (n=1); *Balaenoptera physalus* (n=2); *Grampus griseus* (n=1); *Lagenodelphis hosei* (n=1); *Stenella longirostris* (n=2); *Tursiops truncatus* (n=3); *Stenella frontalis* (n=2); *Sotalia guianensis* (n=1)).

Entre as lesões observadas, destaca-se também a ocorrência de lesões semelhantes a poxvírus em *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera brydei*, *Megaptera novaeangliae*, *Stenella clymene*, *Peponocephala electra* e *Grampus*

griseus (Figura V.5-5 a Figura V.5-10). Poxvírus apresentam uma ampla gama de hospedeiros específicos: desde o vírus da varíola, que infecta o homem, ao vírus da vaccínia, que infecta várias espécies de mamíferos (MCFADDEN, 2005). O poxvírus atualmente identificado em cetáceos foi nomeado temporariamente de *cetacean poxvirus* (CePV), sendo registrado pela primeira vez na década de 70, em *Tursiops truncatus* (GERACI et al., 1979). Posteriormente, foi registrado em várias espécies de odontocetos e mysticetos, embora, até o momento, não se tenham registros, nem mesmo de lesões semelhantes, em *Balaenoptera brydei*, *Stenella clymene*, *Peponocephala electra* e *Grampus griseus*. Para *Balaenoptera physalus*, uma recente determinação molecular confirmou a infecção pelo vírus (MELERO et al., 2005). Para *Megaptera novaengliae*, recentemente, baseado em registros fotográficos, foi observada alta prevalência de lesões semelhantes a poxvírus em uma subpopulação migratória da espécie no Golfo de Omã (VAN BRESSEM et al., 2014). Pouco se sabe sobre o papel de fatores ambientais no desenvolvimento, severidade e epidemiologia dessa doença, ainda que se sugira uma possível relação com contaminantes imunossupressores e/ou situações de estresse crônico. Os dados clínicos e epidemiológicos indicam que o vírus não causa mortalidade, porém pode afetar significativamente indivíduos sem proteção imunológica (VAN BRESSEM et al., 2009).

Chamou a atenção uma interação interespecífica não humana: ao menos 7 espécies apresentaram lesões de prováveis mordidas de tubarão-charuto (*Isistius brasiliensis*) (Figura V.5-11 e Figura V.5-12). Para algumas espécies, entre elas *Stenella attenuata* e *Stenella longirostris*, mordidas de tubarão-charuto foram consideradas a *causa mortis* de infantes (SOUTO et al., 2007). Além de *Tursiops truncatus*, *Stenella attenuata*, *Balaenoptera brydei*, *Stenella frontalis*, *Balaenoptera physalus*, lesões por tubarão-charuto foram observadas em *Balaenoptera borealis* e *Balaenoptera musculus*. Nota-se que a prevalência dessas lesões ocorre em espécies de hábitos mais oceânicos, coerente com a distribuição de *Isistius brasiliensis*, que ocorre principalmente em águas oceânicas quentes e próximas a ilhas.

Registros de cracas pedunculares fixadas ao rostro, como o que ocorreu no primeiro ano em *Delphinus* sp. (Figura V.5-13), não se repetiram nos dois anos

subsequentes. No entanto, um indivíduo de *Stenella frontalis* foi observado com uma deformação de rostró provavelmente congênita (**Figura V.5-14**), considerando que aparentemente realizava atividades vitais normalmente. Outras lesões, como nodulares e cicatrizes, são exemplificadas abaixo, embora a etiologia seja geralmente desconhecida (**Figura V.5-15 a Figura V.5-21**).



Figura V.5-1: Lesão de interação antrópica em *Balaenoptera brydei*: provável mutilação por colisão com embarcação. Avistado no dia 18/02/2017 às 15:43 hrs (-23,84662°; -45,22770°).

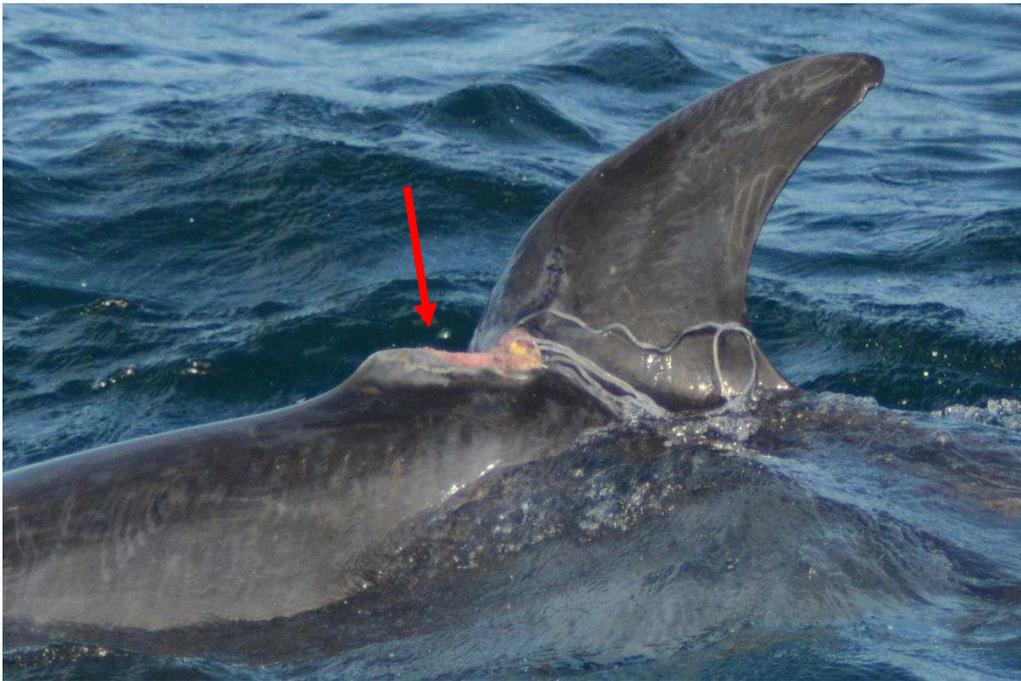


Figura V.5-2: Lesão em *Tursiops truncatus*: provável mutilação por interação com pesca. Avistado no dia 20/07/2017 às 07:34 hrs (-22,81966°; -41,83288°).



Figura V.5-3: Lesão em *Tursiops truncatus*: mutilação na nadadeira dorsal. Avistado no dia 25/02/2016 às 13:25 hrs (-25,48014°; -48,10401°).



Figura V.5-4: Lesão em *Balaenoptera brydei*: lesão focal, discreta em superfície epidérmica de coloração esbranquiçada, focalmente expansiva com bordos irregulares, com provável reação inflamatória ao redor (etiologia desconhecida). Avistado no dia 02/03/2016 às 08:48 hrs (-23,27397°; -44,31604°).



Figura V.5-5: Lesão em *Balaenoptera physalus*: lesão bem delimitada, com os bordos escurecidos, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 06/07/2017 às 12:50 hrs (-27,85924°; -47,10048°).



Figura V.5-6: Lesão em *Balaenoptera brydei*: lesão bem delimitada, com os bordos esbranquiçados, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 13/07/2017 às 08:55 hrs (-26,26151°; -45,95052°).



Figura V.5-7: Lesão em *Balaenoptera borealis*: lesão bem delimitada, com os bordos esbranquiçados, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 01/09/2016 às 14:31 hrs (-26,07750°; -45,58635°).



Figura V.5-8: Lesão em *Grampus griseus*: lesões nodulares, multifocais discretas, semelhantes a poxvírus. Avistado no dia 05/04/2018 às 14:48 hrs (-24,39647°; -42,52979°).



Figura V.5-9: Lesão em *Peponocephala electra*: lesões nodulares, multifocais discretas, semelhantes a poxvírus. Avistado no dia 06/04/2018 às 07:50 hrs (-24,29931°; -42,39903°).



Figura V.5-10: Lesão em *Stenella clymene*: lesão bem delimitada, com centro escurecido, multifocal discreta (provável poxvírus). Avistado no dia 08/07/2017 às 09:28 hrs (-27,34885°; -46,41224°).



Figura V.5-11: Lesão em *Balaenoptera borealis*: possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 21/07/2017 às 16:12 hrs (-23,92087°; -42,20885°).



Figura V.5-12: Lesão em *Balaenoptera musculus*: ferida aberta multifocal, possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 22/07/2017 às 10:07 hrs (-24,19142°; -42,41624°).

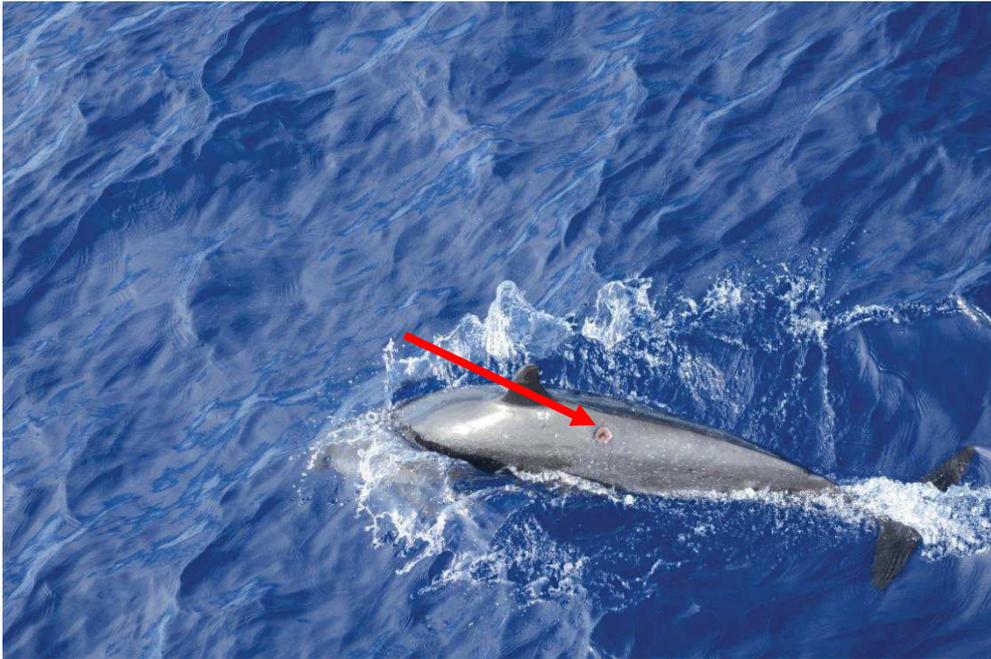


Figura V.5-13: Lesão em *Stenella attenuata*: ferida aberta, possível mordida de tubarão-charuto. Avistado no dia 05/04/2018 às 09:48 hrs (-24,39647°; -42,52979°).



Figura V.5-14: Lesão em *Delphinus delphis*: material não identificado (possível craca peduncular) aderido ao rosto, aparentemente acometendo mandíbula e maxila. Avistado no dia 28/02/2016 às 10:55 hrs (-23,97636°; -45,54699°).



Figura V.5-15: Provável deformação congênita em rosto de *Stenella frontalis*. Avistado no dia 25/07/2017 às 08:38 hrs (-23,47333°; -44,85064°).

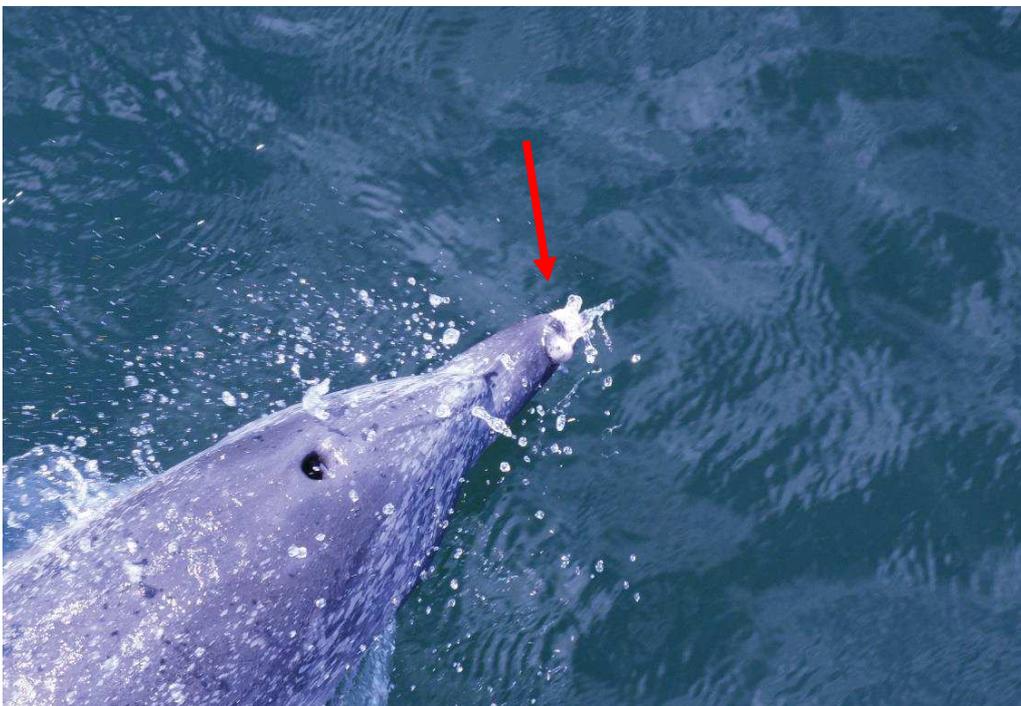


Figura V.5-16: Lesão em *Stenella frontalis*: lesão nodular, focal, circunscrita, bem delimitada em região de maxila direita (etiologia desconhecida). Avistado no dia 26/02/2016 às 13:56 hrs (-24,81083°; -47,24952°).



Figura V.5-17: Lesão em *Balaenoptera borealis*: deformidade na nadadeira dorsal. Avistado no dia 25/08/2016 às 06:44 hrs (-23,64270°; -42,08423°).



Figura V.5-18: Lesão em *Balaenoptera brydei*: lesão bem delimitada, com o centro deprimido, discreto-moderada, multifocal (etiologia desconhecida). Avistado no dia 04/02/2017 às 10:54 hrs (-25,92682°; -45,74579°).



Figura V.5-19: Lesão em *Stenella frontalis*: lesão nodular (etiologia desconhecida).
Avistado no dia 05/02/2017 às 07:35 hrs (-25,86653°; -45,66082°).



Figura V.5-20: Lesão esbranquiçada de etiologia desconhecida em *Stenella frontalis*:
aparente cicatrização. Avistado no dia 06/02/2017 às 10:14 hrs (-
25,72212°; -45,34461°).



Figura V.5-21: Lesão em *Balaenoptera bonaerensis*: nódulos multifocais. Avistado no dia 23/07/2017 às 16:29 hrs (-23,99304°; -43,11423°).

V.5.2 Contaminantes orgânicos, HPA e Biomarcadores

Este item apresenta resumidamente o Relatório “Considerações sobre os Primeiros Resultados de Análises Químicas de Contaminantes (HPA) e Bio Contaminantes em Cetáceos Obtidos no PMC-BS, de autoria da Dra. Angela de Luca Rebello Wagener (PUC/RJ) apresentado na íntegra no **Anexo V.5.2-1**. Tal relatório foi contratado pela Socioambiental para realizar uma primeira análise dos resultados dos estudos de ocorrência de compostos orgânicos, HPA e Biomarcadores em cetáceos, no âmbito do desenvolvimento do PMC-BS.

Os estudos de ocorrência de compostos orgânicos em cetáceos, HPA e Biomarcadores, foram realizados respectivamente pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP) e pelo Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC). Os dois laboratórios foram contratados pela Petrobras para a análise de amostras de biópsias de cetáceos coletadas no âmbito do PMC-BS. Os trabalhos dos laboratórios mencionados estão sendo desenvolvidos sob a responsabilidade dos profissionais Dr. Rafael André Lourenço (USP) e Afonso Bainy (UFSC).

A fonte de informações e dados que fundamentou a elaboração deste item e o relatório anexo que lhe complementa, foram os 68 laudos emitidos pelo IO/USP (integrante do **Anexo V.5.2-1**) sobre contaminantes, após análises das amostras coletadas pelo PMC-BS nos três primeiros anos do projeto. Para biomarcadores, foram considerados os seguintes relatórios do LABCAI/UFSC: “*Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira, provenientes do PMP-BS e do PMC-BS - Relatório Técnico Anual - Versão 01 (de junho 2018)*”; e “*Serviço de Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira, provenientes do PMP-BS e do PMC-BS - Relatório de Acompanhamento Mensal – RAM 20 - Revisão 01*”.

V.5.2.1 Introdução

O Objetivo dos estudos de contaminantes e Biomarcadores em cetáceos é um dos objetivos definidos no Projeto Executivo do PMC-BS, cujo objetivo geral é: *“Estabelecer bases metodológicas e de dados para o monitoramento de longo prazo de cetáceos na Bacia de Santos e de possíveis interferências sobre estes, gerando parâmetros para a avaliação de impactos potenciais das atividades de produção e escoamento de petróleo e gás, e de outras atividades antrópicas da área de abrangência”*. Neste sentido, esses estudos buscam atender ao seguinte objetivo específico definido no Projeto Executivo do PMC-BS: *“Avaliar o grau de contaminação existente em diferentes espécies de cetáceos por diferentes tipos de agentes químicos”*.

Os mamíferos marinhos estão sujeitos a uma diversidade de riscos derivados da atividade humana. Dentre estas pode-se citar a perda e degradação de habitat, o tráfego marinho, a captura acidental, a sobrepesca, a poluição química e acústica (García-Alvarez et al., 2014). De acordo com Tanabe (2002), a exposição a poluentes e resíduos está entre os riscos mais importantes, o que tem suscitado o crescente número de investigações (Kuehl et al., 1991; Aguilar e Borrell, 1994; Balmer et al., 2011; Kucklick et al., 2011) sobre a presença de contaminantes persistentes como causa relevante do declínio de populações.

Uma parcela significativa das investigações levadas a cabo em cetáceos utiliza a coleta de tecidos (gordura e pele) em animais encalhados e nestes se tem relatado presença de poluentes orgânicos persistentes (POPs) e, em alguns casos, de compostos liberados em processos de combustão incompleta, extração, transporte e processamento de petróleo (HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos).

V.5.2.2 Considerações Preliminares sobre os Primeiros Resultados

V.5.2.2.1 Biomarcadores

O conjunto de biomarcadores acima citados de forma breve fazem parte integrante do presente projeto. A investigação está em fase avançada no que tange o estabelecimento das condições ideais e padronização para aplicação dos

testes aos tecidos já amostrados. Esta é uma etapa crítica para garantia da qualidade dos resultados a se obter (*Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira provenientes do PMP-BS e PMC-BS*, Petrobrás, junho de 2018). Na ausência de resultados de biomarcadores para os animais, cujos tecidos foram sujeitos à análise química para determinação dos HPAs nesta fase, ainda não é possível pesquisar eventuais relações entre o observado através dos marcadores e os dados químicos.

Segundo o referido relatório de “Padronização de Técnicas e Análise de Biomarcadores (...)”, descreve-se a seguir a seleção de espécies definidas para os estudos. Dentre os cetáceos marinhos, está previsto o sequenciamento do transcriptoma de três espécies, duas da subordem Odontoceti e outra da subordem Mysticeti. Portanto, com o intuito de identificar potenciais espécies de cetáceos para o desenvolvimento dos transcriptomas, foi realizado um levantamento de todas as amostras obtidas para biomarcadores moleculares durante as campanhas 1 a 6 de Avistagem Embarcada e as campanhas 1 a 6 de Telemetria realizados no âmbito do PMC-BS. No total, 244 espécimes de 17 espécies foram amostrados ao longo dos seis ciclos de campanhas do PMC-BS. Destes, 197 indivíduos pertencem a 14 espécies da subordem Odontoceti, e 47 espécimes pertencem a sete espécies da subordem Mysticeti.

Frente aos resultados apresentados no PMC-BS, as espécies *Stenella frontalis*, *Tursiops truncatus* e *S. longirostris* representam, respectivamente, 32,5%, 19,3% e 23,8% dos odontocetos biopsados. Dentre os mysticetos, a baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) representa 29,8% dos animais amostrados, seguida da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) com 29,8% das amostragens realizadas no PMC-BS e da baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*) com 17% das amostragens realizadas no PMC. Portanto, até o momento, estas seis espécies possuem indivíduos biopsados com número amostral satisfatório para o desenvolvimento dos transcriptomas. Entretanto, como somente uma espécie de cada subordem será escolhida, fez-se uma busca no banco de dados do NCBI por sequências de genes e proteínas das cinco espécies de cetáceos marinhos. Destes, *T. truncatus* apresentou a maior quantidade de sequências, com 131.061

sequências de nucleotídeos e 54.358 sequências de proteínas depositadas no NCBI. Vale ressaltar que o transcriptoma desta espécie já foi sequenciado em amostras de sangue (MOREY et al., 2016) e pele (VAN DOLAH et al., 2015), corroborando com o grande número de sequências identificadas. Ainda, 19 sequências referentes aos genes que codificam as proteínas citocromo P4501A (CYP1A), fator de transcrição E2F, chaperona HSP70, receptor de estrogênio (ER), receptor de aril hidrocarboneto (AhR) e UDP-glicuroniltransferase (UDPGT) foram identificadas para *T. truncatus* no mesmo banco de dados. Portanto, pode-se concluir que para *T. truncatus* já se encontram disponíveis as sequências de genes previamente selecionados como biomarcadores moleculares, sem a necessidade de sequenciamento do transcriptoma.

Por outro lado, para as demais espécies com boa amostragem, *S. frontalis*, *S. longirostris*, *B. borealis*, *M. novaeangliae* e *B. brydei*, um pequeno número de sequências encontram-se disponíveis. Cabe ressaltar que grande parte das sequências identificadas se referem a genes e/ou proteínas mitocondriais, com nenhuma relação aos genes pré-definidos como potenciais biomarcadores moleculares para os tetrápodes marinhos, com exceção da sequência identificada para AhR em baleia-jubarte (Código de Acesso no GenBank/NCBI 118419961). Portanto, as informações apresentadas, associadas ao número amostral disponível até o momento, reforçam o uso dos odontocetos *S. frontalis* ou *S. longirostris*, e dos mysticetos *B. borealis* ou *B. brydei* como espécies prioritárias para o sequenciamento de transcriptoma visando a identificação de genes biomarcadores moleculares de exposição a contaminantes ambientais.

Destaca-se que inicialmente foi utilizada a quantidade de amostras coletadas e entregues pelo PMP e PMC-BS até dezembro de 2017, sendo que as espécies *S. frontalis*, *B. borealis* e *T. truncatus* foram recomendadas como espécies-alvo de cetáceos para o monitoramento dos biomarcadores moleculares. Entretanto, após a atualização da quantidade de amostras disponível para cada espécie (maio de 2018) e consulta à equipe técnica do PMC-BS, que esclareceu questões de uso de habitat, hábitos migratórios e alimentares de cetáceos, decidiu-se pela revisão da proposta, conforme apresentado na reunião realizada com o IBAMA em 07/05/2018, tendo sido proposta a substituição de *S. frontalis* por *S.*

longirostris e de *B. borealis* por *B. brydei*.

Em termos ecológicos, o golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) é encontrado no Oceano Atlântico, desde o sul do Brasil e até a costa oeste da África, tanto em regiões costeiras até águas oceânicas profundas, onde geralmente se desloca em busca de cardumes de peixes migratórios. Não é considerada uma espécie migratória, e apresenta hábito alimentar diverso, alimentando-se preferencialmente de peixes epi e mesopelágicos, além de lulas e invertebrados bentônicos (LOPES et al., 2012). De acordo com a Lista Vermelha da IUCN, há dados insuficientes para estabelecer o seu estado de conservação (HAMMOND et al., 2012).

Similarmente, para o golfinho-rotador (*S. longirostris*) ainda não está estabelecido o estado de conservação da espécie (BEARZI et al., 2012). Entretanto, sabe-se que se trata de uma espécie com ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os oceanos dos hemisférios norte e sul. Embora geograficamente bem distribuído, este pequeno cetáceo parece ter preferência por áreas de talude continental, sobrepondo-se às áreas de exploração da Bacia de Santos (PETROBRAS, 2017).

Em relação aos mysticetos, a baleia-sei (*B. borealis*) caracteriza-se por apresentar uma ampla distribuição geográfica, sendo subdividida em duas subespécies. Apresenta um comportamento migratório ao longo da costa brasileira que é desconhecido, e se alimenta de copépodos, eufasídeos e anfípodos. Em função da captura ostensiva entre as décadas de 1950 e 1980, as populações declinaram de forma vertiginosa, sendo atualmente considerada como uma espécie ameaçada de extinção pela IUCN (REILLY et al., 2008a). A segunda provável espécie de mysticeto para desenvolvimento e análise de biomarcadores moleculares, a baleia-de-bryde (*B. brydei*) é considerada “deficiente em dados” pela IUCN (REILLY et al., 2008a) e, ao contrário do comportamento observado para os demais mysticetos, não apresenta hábito migratório, permanecendo na costa brasileira ao longo do ano onde se alimenta de recursos da nossa costa (PETROBRAS, 2017). Por outro lado, a terceira provável espécie de mysticeto para desenvolvimento e análise de biomarcadores moleculares, a baleia-jubarte (*M. novaeangliae*) é considerada “pouco preocupante” em termos de conservação

(REILLY et al., 2008b), devido à significativas ações conservacionistas em todo o mundo. Esta espécie cosmopolita caracteriza-se por ser migratória, com períodos de migração bem definidos entre as áreas de alimentação e reprodução (ANDRIOLO; ZERBINI, 2010). Assim elegeu-se como espécie-alvo a baleia-de-Bryde por ser a única a se alimentar principalmente em águas brasileiras e de ocorrência ampla na Bacia de Santos.

Dentre as potenciais espécies-alvo de cetáceos delineadas acima, iniciou-se a padronização de análise de biomarcadores moleculares apenas para *T. truncatus*, tendo em vista a existência de sequências gênicas para esta espécie depositadas no GenBank.

V.5.2.2.2 Análises Químicas

No que tange as análises químicas, os métodos encontram-se estabelecidos, já tendo sido obtidos resultados para os tecidos dos animais amostrados (gordura). Os seguintes compostos foram objeto das análises, conforme informado nos laudos emitidos pelo laboratório responsável: naftaleno, 2-metilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, C2-naftaleno, C3-naftaleno, C4-naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, C1-fluoreno, C2-fluoreno, C3-fluoreno, dibenzotiofeno, C1-dibenzotiofeno, C2-dibenzotiofeno, C3-dibenzotiofeno, fenantreno, C1-fenantreno-antraceno, C2-fenantreno-antraceno, C3-fenantreno-antraceno, C4-fenantreno-antraceno, antraceno, fluoranteno, pireno, C1-fluoranteno-pireno, C2-fluoranteno-pireno, benzo(a)antraceno, criseno, C1-criseno, C2-criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

Foram encontrados resultados maiores que LD e LQ (limites de detecção e quantificação) em 16 das 36 amostras analisadas. A presença predominante de naftaleno é a feição mais evidente, como se verifica na Figura 6. Os somatórios mais elevados das concentrações encontram-se na amostra 058BGC (*T. truncatus*, fêmea), 16 HPAs = 4568,0 ng g⁻¹p.s. e Total HPAs = 4757,6 ng g⁻¹ p.s., seguida da amostra 073BGC (*B. borealis*, macho), 16HPAs= 4464,1 ng g⁻¹

p.s. e Total HPAs = 4584,2 ng g⁻¹ p.s. e da 110BGC (*S. brandanensis*, macho), 16 HPAs = 3709,3 ng g⁻¹ p.s. e Total HPAs = 3821,2 ng g⁻¹ p.s. Estas concentrações são menores ou da mesma ordem de grandeza daquelas reportadas em trabalhos publicados, alguns dos quais citados acima. A predominância do naftaleno também é frequentemente relatada na literatura.

Um segundo lote de amostras (32 amostras) foi analisado em condições diferentes daquelas acima referidas, em função da disponibilidade de massa menor de amostra. Foi utilizada uma massa de amostra 2,5 vezes menor, ou seja de 0,10 g, mas o extrato sofreu uma redução à 0,25 mL, ou seja, 4 vezes mais concentrado do que as amostras anteriores. Esta maior redução do volume do extrato final, mesmo com a massa menor, levou o LD e LQ para um patamar, segundo os responsáveis pela determinação analítica, 1,6 vezes inferior àqueles reportados anteriormente (entre 1,9 ng g⁻¹ p.s. para naftaleno e 0,1 ng g⁻¹ p.s. para os de maior massa molecular). Para os compostos de maior massa molecular, porém, não houve ganhos significativos. A presença de naftaleno em todas as amostras é uma garantia de que a redução do extrato a volume inferior a 1 mL (utilizado na maioria dos estudos) não teria resultado em perdas significativas dos analitos mais voláteis.

As concentrações totais de HPAs variaram entre 42,5 ng g⁻¹ (amostra 001) e 2904,1 ng g⁻¹ (amostra 143). Diferentemente das amostras do primeiro lote, encontram-se aqui HPAs de massa molecular mais elevada do que o antraceno. Naftaleno é ubíquo, mas nenhuma das amostras apresentou uma série alquilada com características petrogênicas (distribuição dos homólogos em formato de sino), há apenas em algumas o C1N e C1Fe. A amostra 143 apresenta concentrações significativas de B(a)Pi (247 ng g⁻¹). As tipologias aqui encontradas assemelham-se de forma mais clara ao esperado para resíduos de processos de combustão incompleta do que aquelas do primeiro lote, entre outras feições, pela ausência de séries alquiladas, as quais permitiriam avaliar melhor a questão de origem petrogênica ou pirolítica.

Como mostra a **Figura V.2.2-1**, as maiores concentrações de todos os compostos mais frequentemente encontrados nas amostras da Figura 7 estão na amostra 143 (*Turciops truncatus*; Lat -22,81966 – Lon -41,83288), proveniente

das proximidades da Bacia de Campos, enquanto os mínimos são mais frequentes na amostra 173 (*Turciopstruncatus*; Lat -24,45574 – Lon -44,10591) obtida na área da Bacia de Santos.

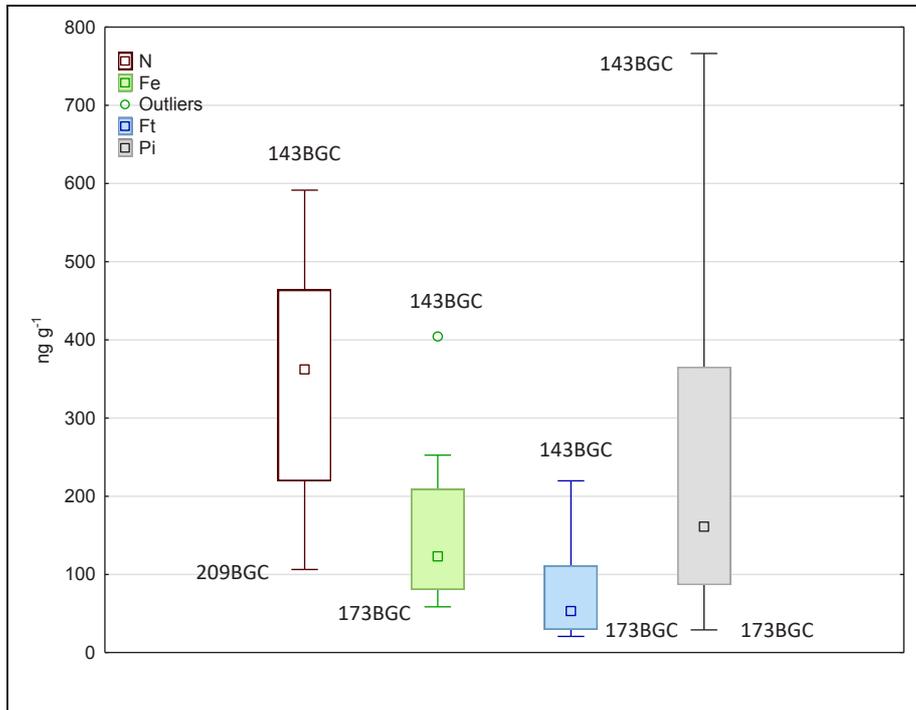


Figura 5.2.2-1: Box-plot representando a mediana, máximos e mínimos das concentrações dos compostos mais relevantes encontrados nas amostras elencadas na Figura 6 (BGC: 123, 125, 128, 143, 173, 175, 176, 188, 193, 208, 209, 215, 216, 217).

Apesar do naftaleno estar presente em todas as amostras (média 194 +/- 169 ng g⁻¹), a média das concentrações acima do LD é muito inferior àquela encontrada para o primeiro lote (1078 +/- 1165 ng g⁻¹), que apresentou várias amostras com concentração de N abaixo do LD, mas alguns picos de concentração mais significativos.

V.5.2.3 Recomendações

No que tange às condições das análises químicas, observa-se a aplicação de princípios que garantem a qualidade dos dados obtidos. Os limites de detecção e quantificação são adequados para indicação de possível exposição a níveis de HPAs que representem risco à biota. Deve-se levar em conta que não se tem uma informação das concentrações médias, obtidas após observações em várias ocasiões ao longo dos anos, nos substratos onde habitam e se alimentam os animais objeto do projeto. Porém, nos trabalhos publicados sobre a presença e natureza dos HPAs na Bacia de Campos (Falcão et al., 2017) os autores, que analisaram amostras coletadas em duas ocasiões distintas, relatam concentrações abaixo daquelas consideradas potencialmente danosas à biota (Buchman, 2008), tanto nos sedimentos como nas águas superficiais.

Caso seja desejável o incremento da detecção, deve ser averiguada a possibilidade de se trabalhar com massas maiores compostas a partir de um “pool” de amostras de animais da mesma espécie e mesmo sexo, e que sabidamente sejam residentes na mesma região amostrada, por exemplo integrantes do mesmo grupo amostrado. Esta possibilidade deve ser averiguada em relação à sua viabilidade juntamente às equipes executoras dos trabalhos e o órgão ambiental. Neste caso, é também maior a garantia de homogeneidade das amostras pois passa a ser possível o uso de Ultra turax.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este item aborda as considerações feitas à luz dos resultados obtidos ao longo de 3 anos de execução o PMC, sendo estes apontamentos subdivididos em três subitens, conforme apresentado a seguir.

VI.1 Avanços obtidos em relação aos anos anteriores

Abaixo descrevemos os principais avanços do presente relatório em relação ao relatório do ano 2, por área temática:

- *Avistagem embarcada*: A presença de duas espécies novas no terceiro ano de monitoramento para o PMC-BS - *Peponocephala electra* e *Legenodelphis hosei* - aumentou a riqueza registrada na Bacia de Santos de 23 para 25 espécies. Ao mesmo tempo em que foram identificadas áreas recorrentes de concentração (alta densidade), também foi possível confirmar um padrão de variação temporal de distribuição, que deve ser mais bem investigado e relacionado com variáveis oceanográficas dinâmicas nos próximos anos.

No terceiro ano, foram incluídas análises de cruzamentos de dados de duas novas variáveis antropogênicas importantes (pesca e ruídos), com a utilização de um conjunto robusto de variáveis ambientais e antrópicas na modelagem de habitat. Houve um refinamento das estimativas de densidade e abundância, com aumento da precisão à medida que aumentou o “n” amostral e a estimativa de parâmetros populacionais para pelo menos duas espécies, consistindo em estimativas inéditas para a costa brasileira e Bacia de Santos.

- *Bioacústica*: Apesar de não ter havido a inclusão de novas espécies na Sonoteca do PMC-BS, houve um aumento das amostras de vocalizações das espécies previamente catalogadas, o que permitiu a aplicação de novos métodos estatísticos e análises mais robustas para comparação das espécies, principalmente para os assovios dos delfínidos. Ao final do terceiro ano de monitoramento, houve progresso na classificação das espécies da Sonoteca, por meio do uso de quatro diferentes classificadores de assovios de delfínidos, e

uma maior taxa de acertos na identificação taxonômica.

Houve progresso metodológico no processamento e na análise de cliques e esforços para o desenvolvimento de rotinas de processamento e aplicação de detectores, que estão sendo empregados para tornar o processo mais eficiente e automatizado, possibilitando avançar ainda mais na caracterização dos cliques. Por fim, os avanços no processamento e classificação, tanto dos cliques quanto os assovios, permitirão o uso combinado dos dados com objetivo de aumentar a eficiência de classificação das espécies através do MAP.

- *Telemetria*: A telemetria avançou consideravelmente na obtenção de dados durante o terceiro ano do projeto. Pela primeira vez, foi possível a marcação de um *Physeter macrocephalus*, cujo transmissor implantável teve a maior duração registrada até o momento, de 60 dias. Para outras espécies, houve um aumento no tamanho amostral, como foi o caso do *Tursiops truncatus* (totalizando mais de dez transmissores implantados em três anos). Também foi realizada as primeiras marcações de *Peponocephala electra*. Houve um avanço significativo na qualidade da programação dos transmissores satelitais. O membro da equipe que vinha sendo treinado desde a 1ª Campanha passou a atuar como tagueador oficial, permitindo maior autonomia para a realização das campanhas em relação à disponibilidade de agenda de tagueadores estrangeiros ou de fora da equipe do projeto.

- *Genética*: O aumento do número amostral para algumas espécies está possibilitando análises mais robustas de estrutura populacional, e estimativas mais amplas de diversidade genética e proporção sexual. Além disso, com a ampliação do tamanho amostral, foi detectada pela primeira vez uma recaptura genética de um indivíduo de *S. longirostris*, e ao longo da continuidade do monitoramento, a tendência de recapturas certamente aumentará. Finalmente, no terceiro ano, foi testada a metodologia de estimativa epigenética da idade das baleias-jubarte, e, embora as primeiras estimativas de idade tenham sido obtidas para a espécie na população do Atlântico Sul Ocidental, ainda existe a necessidade de aprimoramento do método.

- *Foto-identificação*: Até o final do 3º ano do PMC foi possível implementar catálogo de 24 espécies, sendo que no último ano três novas espécies no último

ano (*Lagenodelphis hosei*; *Peponocephala electra* e *Physeter macrocephalus*) tiveram a catalogação por foto-identificação iniciada e 14 espécies tiveram seu catálogo incrementado. Os primeiros movimentos de grande escala foram identificados por comparações de catálogos. Assim, o protocolo de triagem e processamento foi consolidado.

- *Compostos orgânicos, HPA e biomarcadores*: Foi apresentada uma primeira análise dos resultados dos estudos de ocorrência de compostos orgânicos, HPA e biomarcadores em cetáceos da Bacia de Santos.

VI.2 Avaliação Crítica dos Resultados orientada para os objetivos

Tendo em vista os objetivos definidos no Projeto Executivo do PMC-BS, apresentamos uma avaliação crítica dos resultados obtidos ao longo dos 3 anos de trabalho orientada para os objetivos do Projeto. Segue cada objetivo específico com comentários.

VI.2.1 Ampliar o grau de conhecimento sobre a riqueza e a distribuição de espécies de cetáceos na Bacia de Santos.

Até o momento já foram registradas 25 das 38 espécies esperadas para a Bacia de Santos. Apesar de que não foram realizados registros de espécies novas para a região, grande parte dos dados obtidos são inéditos e de grande relevância para a Bacia de Santos e para a costa do Brasil.

Apesar do terceiro ano do PMC ainda tenham sido observadas espécies sem registro anterior, como o golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*) e o golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), a taxa de registro de novas espécies vem diminuindo, indicando uma boa amostragem da comunidade. Foram geradas informações relevantes sobre as taxas de encontro (frequência relativa) para as espécies, com identificação das espécies mais comuns e de espécies pouco frequentes ou raras. Foi possível determinar fatores responsáveis

por estruturar a comunidade de cetáceos na Bacia de Santos, como a variação espacial e sazonal de algumas espécies. Espera-se consolidar essas informações nos próximos anos de PMC.

VI.2.2 Estimar a densidade e a abundância das espécies de cetáceos mais comuns na Bacia de Santos, por meio da implementação e avaliação de métodos complementares.

No terceiro ano, com o aumento da amostra pelos métodos de avistagem embarcada e aérea, foi possível melhorar consideravelmente a precisão das estimativas de densidade e abundância de odontocetos e mysticetos. No terceiro ano, também foi possível explorar estimativas para algumas espécies mais comuns, como a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) e o golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*). Estas estimativas são inéditas para a costa brasileira e/ou para a Bacia de Santos

Para as detecções acústicas, o cachalote (*Physeter macrocephalus*) é a única espécie, até o momento, com registros que viabilizaram a realização das primeiras estimativas populacionais para a espécie na costa do Brasil.

Ao final do terceiro ano de coleta do PMC-BS, a série temporal já permite inferências sobre sazonalidade de algumas espécies. Espera-se que seja possível inferir sobre tendências populacionais para algumas espécies de cetáceos ao fim de 6 anos de coleta, embora seja aceito que um poder aceitável de detectar tendências populacionais em cetáceos só seja possível com séries temporais maiores que 10 anos (GERRODETTE, 1987).

VI.2.3 Levantar informações sobre o uso de habitats de algumas espécies, implementando diferentes métodos conjuntamente e testando a eficácia dos mesmos.

Foram produzidas informações importantes e inéditas sobre a distribuição de cetáceos e suas áreas de concentração na Bacia de Santos. Os resultados obtidos até o momento demonstraram uma distribuição heterogênea na Bacia de Santos, tanto para mysticetos como para odontocetos, sendo possível identificar diferentes regiões de concentração. Estas áreas de concentração sugerem que o

talude continental e determinadas regiões costeiras, como a região do Cabo Frio, são as principais áreas de concentração de cetáceos na Bacia de Santos.

A caracterização dos habitats das espécies permite afirmar que existe uma estruturação da comunidade de cetáceos que pode ser descrita pela profundidade. Algumas espécies são estritamente costeiras, algumas demonstram preferência pelas regiões do talude continental e outras por regiões oceânicas. Determinadas espécies se movimentam entre diferentes habitats oceânicos e costeiros, demonstrando flexibilidade no uso de habitats.

Ao longo dos próximos anos, essas informações devem ser incrementadas e refinadas. Este refinamento envolve o aumento da amostra para as espécies, a ampliação do rol de variáveis ambientais e antrópicas utilizadas nos modelos e o uso de ferramentas estatísticas mais robustas.

VI.2.4 Obter informações sobre padrões comportamentais de algumas espécies, buscando avaliar, quando possível, a suscetibilidade destas diante de atividades antrópicas.

Com os dados obtidos por meio das campanhas de telemetria, foi possível a descrição detalhada do comportamento de mergulho para oito espécies. Apesar do reduzido número de indivíduos marcados, o conjunto de dados relativo ao comportamento de mergulho foi significativo, sendo mais representativo para o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*); a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*); o cachalote (*Physeter macrocephalus*); e a orca (*Orcinus orca*).

Nas campanhas de telemetria, também foi possível o registro do comportamento acústico de sete espécies utilizando os DTAGs. O uso pioneiro deste tipo de tag na Bacia de Santos e no Brasil permitiu descrever o mergulho de diferentes espécies em detalhes, bem como dados inéditos sobre o repertório acústico e sobre a alimentação de balaenopterídeos que frequentam a costa do Brasil dentro de seu ciclo migratório anual.

O repertório de cliques e assovios das espécies de cetáceos da Bacia de Santos têm sido descrito com dados coletados por diferentes técnicas complementares, com destaque para o Monitoramento Acústico Passivo (MAP). Os sons característicos das diferentes espécies amostradas têm sido usado com

sucesso para a identificação taxonômica, inclusive para espécies de difícil detecção e identificação visual.

VI.2.5 Avaliar o grau de contaminação existente em diferentes espécies de cetáceos por diferentes tipos de agentes químicos.

As informações sobre grau de contaminação em cetáceos foram apresentadas pela primeira vez e de forma preliminar neste relatório. Espera-se que nos próximos anos haja um incremento das espécies avaliadas e no número de amostras considerado para uma avaliação mais abrangente e robusta sobre o grau de contaminação.

VI.2.6 Avaliar o estado de saúde de cetáceos, por meio de registro de lesões epidérmicas ou traumas, que possam ser identificados pela aplicação da técnica de foto-identificação.

Embora o número de lesões registradas pelo esforço de fotoidentificação não seja alto até o momento, com os dados obtidos foi possível identificar as lesões com maior frequência de ocorrência. O monitoramento de lesões e condição corporal, associado a outras informações, poderá contribuir para avaliação do estado de saúde e suas possíveis causas.

As lesões mais frequentes entre espécies foram: ferida aberta (ocorrendo em 75% das espécies), nódulos multifocais (ocorrendo em 67% das espécies), cicatriz esbranquiçada (54% das espécies) e lesão semelhante a poxvírus (ocorrendo em 50% das espécies). O monitoramento da prevalência destas lesões ao longo do tempo pode fornecer importantes informações sobre a saúde das populações.

VI.2.7 Promover o registro e a avaliação preliminar de possíveis interferências antrópicas na comunidade de cetáceos na Bacia de Santos.

A investigação sobre possíveis interferências antrópicas sobre os cetáceos ainda é incipiente, com cruzamento da frequência de registros em quadrantes e variáveis antrópicas de diferentes naturezas. Espera-se obter

resultados mais substanciais nos próximos anos com o refinamento das análises no que tange as variáveis disponíveis para cruzamento e técnicas de modelagem.

Os dados de lesões epidérmicas revelam o caráter cumulativo dos impactos antrópicos sobre cetáceos, com registros de lesões ocasionadas pela pesca, por atropelamento por embarcações e diferentes patologias, que podem estar relacionadas com a qualidade ambiental. Porém espera-se incrementar a qualidade destes dados nos próximos anos com o aumento da amostra.

VI.2.8 Avaliar a funcionalidade e a eficácia da aplicação integrada e complementar dos diversos métodos previstos para o atendimento dos objetivos de monitoramento.

Diversas análises apresentadas neste relatório foram realizadas combinando informações coletadas por diferentes plataformas de pesquisa e métodos usados no âmbito do PMC-BS. Análises específicas mostram a complementariedade das técnicas utilizadas, como por exemplo o uso de técnicas visuais e acústicas combinadas. Espera-se reforçar a complementariedade e sinergia das técnicas com análises mais aprofundadas que serão realizadas nos próximos anos do PMC-BS.

VI.3 Avaliação de aspectos antrópicos

Considerando que o presente projeto está vinculado ao licenciamento ambiental do Pólo Pré-Sal da Bacia de Santos, cabe uma breve avaliação dos resultados obtidos sobre interferências antrópicas sobre os cetáceos. De especial interesse são possíveis interferências das atividades de produção e exploração de óleo e gás. A modelagem de uso espacial, considerando fatores oceanográficos, incorporou pelo menos três variáveis que descrevem atividades humanas relacionadas à indústria petrolífera, quais sejam: proximidade das unidades de produção de óleo e gás, intensidade do tráfego de embarcações e intensidade dos ruídos em determinadas frequências de interesse para a poluição sonora.

A modelagem de habitat não indicou nenhum efeito de variáveis antrópicas

sobre a distribuição de odontocetos. Para mysticetos o modelo apontou pelo menos duas variáveis antrópicas importantes em explicar a distribuição de mysticetos. Entretanto, a interpretação dos resultados, com relação positiva entre mysticetos e atividades de pesca e relação negativa entre mysticetos e distância das unidades de produção não são facilmente interpretáveis. Estas relações parecem ser em virtude de correlações sem natureza causal. Esperava-se que os mysticetos evitassem regiões de maior atividade de pesca e regiões próximas das unidades de produção, dado o intenso tráfego de embarcações e ruídos. Entretanto, as relações observadas e evidenciadas pelos melhores modelos foram na direção oposta e, portanto, merecem ser investigadas mais profundamente nos próximos anos. Em virtude destes resultados, ainda não existem evidências conclusivas de alguma interferência negativa de atividades antrópicas no uso espacial dos cetáceos.

Outros métodos como a avaliação de lesões epidérmicas ressaltam a existência de diferentes danos causados por atividades antrópicas em cetáceos, como a pesca e o tráfego de embarcações. Estas informações reforçam a existência de múltiplos impactos antrópicos na região da Bacia de Santos que possuem efeito sinérgico e cumulativo sobre os cetáceos. Espera-se que o incremento na quantidade de dados e refinamentos analíticos possam lançar luz sobre esta questão nos próximos anos do PMC-BS.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO-GUTIÉRREZ, A. 2009. Habitat use. In: **Encyclopedia of Marine Mammals** (Ed. by Perrin, W.F.; Wursig, B. & Thewissen, J.G.M.). San Diego: Academic. pp. 524-529.
- AGUILAR DE SOTO, N.; MADSEN, P. T.; TYACK, P.; ARRANZ, P.; MARRERO, J.; FAIS, A; REVELLI, E. & JOHNSON, M. A. 2012. No shallow talk: Cryptic strategy in the vocal communication of Blainville's beaked whales. **Marine Mammal Science**, 28 (2).
- AGUILAR, A. & BORRELL, A. 1994. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. **Sci. Total Environ.** 154, 237-247.
- ALTMANN, J. 1974. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, 49: 227–265.
- ALVES, F.; DINIS, A.; CASÇÃO, I. & FREITAS, L. 2010. Bryde's whale (*Balaenoptera brydei*) stable associations and dive profiles: new insights into foraging behavior. **Mar Mamm Sci** 26: 202–212.
- ANDRIOLO, A.; DA ROCHA, J.M.; ZERBINI, A. N.; SIMÕES-LOPES, P.C.; MORENO, I.B.; LUCENA, A.; DANILEWICZ, D. & BASSOI, M. 2010. Distribution and relative abundance of large whales in a former whaling ground off eastern South America. **Zoologia**, 27 (5): 741-750.
- ANDRIOLO, A.; KINAS, P.G.; ENGEL, M.H. & MARTINS, C.C.A. 2010. Humpback whale population estimates and distribution along the Brazilian breeding ground. **Endangered Species Research**, 11: 233-243.
- ANDRIOLO, A.; MARTINS, C.C.A.; ENGEL, M.H. & PIZZORNO, J.L. 2006. The first aerial survey to estimate abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the breeding ground off Brazil (Breeding Stock A). **Journal of Cetacean Research and Management**, 8: 307-311.
- ANTUNES, R.; SCHULZ, T.; GERO, S.; WHITEHEAD, H.; GORDON, J. & RENDELL, L. 2011. Individually distinctive acoustic features in sperm whale codas. **Animal Behaviour**, 81(4): 723–730.

- AOKI, K.; AMANO, M.; MORI, K.; KOUROGI, A.; KUBODERA, T. & MIYAZAKI, N. 2012. Active hunting by deep-diving sperm whales: 3D dive profiles and maneuvers during bursts of speed. **Marine Ecology Progress Series**, 444: 289–301.
- AOKI, K.; AMANO, M.; YOSHIOKA M.; MORI, K.; TOKUDA, D. & MIYAZAKI, N. 2007. Diel diving behavior of sperm whales off Japan. **Marine Ecology Progress Series**, 349: 277–287.
- AU, W.W. 1993. **The sonar of dolphins**. Springer-Verlag, New York, NY.
- AU, W.W. L. 2004. Echolocation signals of wild dolphins. **Acoustical Physics**, 50(4): 454-462.
- AU, W.W.; BRANSTETTER, B.; MOORE, P.W. & FINNERAN, J.J. 2012a. The biosonar field around an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 131(1): 569-576.
- AU, W.W.; BRANSTETTER, B.; MOORE, P.W. & FINNERAN, J.J. 2012b. Dolphin biosonar signals measured at extreme off-axis angles: Insights to sound propagation in the head. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 132(2): 1199-1206.
- AZZOLIN, M.; GANNIER, A.; LAMMERS, M.O.; OSWALD, J.N.; PAPALE, E.; BUSCAINO, G.; BUFFA, G.; MAZZOLA, S. & GIACOMA, C. 2014. Combining whistle acoustic parameters to discriminate Mediterranean odontocetes during passive acoustic monitoring. **Journal of the Acoustic Society of America**, 135(1): 502-512.
- BAIRD, R.W.; LIGON, A. & HOOKER, S.K. 2000. **Sub-surface and night-time behavior of humpback whales off Maui, Hawaii: a preliminary report**. 2000. Hawaiian Islands Humpback Whale National Marine Sanctuary, Kihei, HI.
- BALENSIEFER, D.C.; MARCONDES, M.C.C.; PRETTO, D.J.; CYPRIANO-SOUZA, A.L. & LUNA, F.O. 2014. Antarctic minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*, Burmeister, 1867) in the Tapajós river, Amazon basin, Brazil. **Aquatic Mammals** 40(2): DOI 10.1578/AM.40.2.2014.
- BALMER, B.; SCHWACKE, L.; WELLS, R.; GEORGE, C.; HOGUET, J.; KUCKLICK, J.; LANE, S.; MARTINEZ, A.; MCLELLAN, W.; ROSEL, P.; ROWLES, T.; SPARKS, K.; SPEAKMAN, T.; ZOLMAN, E. & PABST, D. 2011.

- Relationship between persistent organic pollutants (POPs) and ranging patterns in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal Georgia, USA. **Sci. Total Environ.** 409, 2094–2101.
- BARACHO, C.; CIPOLOTTI, S.; MARCOVALDI, E.; APOLINÁRIO, M. & SILVA, M.B. 2007. The occurrence of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the biological reserve of Atol das Rocas in north-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 2 - Biodiversity Records (Published online).
- BARLOW, J. & GISINER, R. 2006. Mitigating, monitoring and assessing the effects of anthropogenic sound on beaked whales. **Journal of Cetacean Research and Management**, 7(3): 239-249.
- BARLOW, J., & TAYLOR, B. L. 2005. Estimates of sperm whale abundance in the northeastern temperate Pacific from a combined acoustic and visual survey. **Marine Mammal Science**, 21(3): 429-445.
- BARROSO, E.N.; PÉREZ, O.Z.; MORENO, C.M. & BOUCHOT, G.G. 1998. Hydrocarbon and Organochlorine Residue Concentrations in Sediments from Bay of Chetumal, Mexico. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 61(1): 61-80.
- BAUMANN-PICKERING, S.; MCDONALD, M.A.; SIMONIS, A.E.; SOLSONA-BERGA, A.; MERKENS, K.P.; OLESON, E.; ROCH, M.A.; WIGGINS, S.M.; RANKING, S.; YACK, T. & HILDEBRAND, J.A. 2013. Species-specific beaked whale echolocation signals. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 134(3): 2293-2301.
- BAUMANN-PICKERING, S.; SIMONIS, A.E.; OLESON, E.M.; BAIRD, R.W.; ROCH, M.A., & WIGGINS, S.M. 2015. False killer whale and short-finned pilot whale acoustic identification. **Endangered Species Research**, 28(2): 97-108.
- BAUMANN-PICKERING, S.; WIGGINS, S.M.; HILDEBRAND, J.A.; ROCH, M.A. & SCHNITZLER, H.U. 2010. Discriminating features of echolocation clicks of melon-headed whales (*Peponocephala electra*), bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), and Gray's spinner dolphins (*Stenella longirostris longirostris*). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 128(4): 2212-2224.
- BAUMANN-PICKERING, S.; WIGGINS, S.M.; ROTH, E.H.; ROCH, M.A.; SCHNITZLER, H.U. & HILDEBRAND, J.A. 2010. Echolocation signals of a

- beaked whale at Palmyra Atoll. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 127(6): 3790-3799.
- BAUMANN-PICKERING, S.; YACK, T.M.; BARLOW, J.; WIGGINS, S.M. & HILDEBRAND, J.A. 2013b. Baird's beaked whale echolocation signals. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 133(6), 4321-4331.
- BAUMGARTNER, M.F.; VAN-PARIJS, S.M.; WENZEL, F.W.; TREMBLAY, C.J.; ESCH H.C. & WARDE, A.M. 2008. Low frequency vocalizations attributed to sei whales (*Balaenoptera borealis*). **Journal of Acoustical Society of America**, 124: 1339–1349.
- BAZÚA-DURAN C. & AU, W.W.L. 2002. The whistles of Hawaiian spinner dolphins. **J. Acoust. Soc. Am.** 112(6): 9-12.
- BEARZI, G. 2000 First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. **Journal of Cetacean Research and Management**, 2: 217–221.
- BECKER, E. & QUANG, P.A. 2009. Gamma-Shaped Detection Function for Line-Transect Surveys with Mark-Recapture and Covariate Data. **Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics**, 14(2): 207-223.
- BEST, P.B.; REEB, D.; REW, M.B.; PALSBOELL, P.J.; SCHAEFF, C. & BRANDÃO, A. 2005. Biopsying southern right whales: their reactions and effects on reproduction. **Journal of Wildlife Management**, 69: 1171–1180.
- BONATO, M.; PAPALE, E.; PINGITORE, G.; RICCA, S.; ATTOUMANE, A.; OULEDI, A. & GIACOMA, C. 2015. Whistle characteristics of the spinner dolphin population in the Comoros Archipelago. **The Journal of the Acoustical Society of America** 138: 3262–3271.
- BONJEAN, F. & LAGERLOEF, G.S.E. 2002. Diagnostic Model and Analysis of the Surface Currents in the Tropical Pacific Ocean. **Journal of Physical Oceanography**, 32(10): 2938-2954.
- BORMPOUDAKIS, D.; SUEUR, J. & PANTIS, J.D. 2013. Spatial heterogeneity of ambient sound at the habitat type level: ecological implications and applications. **Landscape Ecology** 28, 495–506.
- BORTOLOTTI, G.A.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; FREIRE, A.S. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2016. Young humpback whale *Megaptera novaeangliae* feeding

- in Santa Catarina coastal Waters, Southern Brazil, and a ship strike report. **Marine Biodiversity Reports**, 9: 29.
- BRASIL. Petrobras. 2015. Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos PMC-BS.
- BROWN, M.R.; CORKERON, P.J.; HALE, P.T.; SCHULTZ, K.W. & BRYDEN, M.M. 1995. Evidence for a sex-segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaengliae*). **Proc. R. Soc.** London 259: 229-234.
- BROWN, M.R.; CORKERON, P.J.; HALE, P.T.; SCHULTZ, K.W. & BRYDEN, M.M. 1994. Behavioral responses of east Australian humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to biopsy sampling. **Marine Mammal Science**, 10: 391–400.
- BROWN, N.W., HELBIG, R., BOAG, P.T., GASKIN D.E. & WHITE, B.N. 1991. Sexing beluga whales (*Delphinapterus leucas*) by means of DNA markers. **Canadian Journal of Zoology**, 69(7): 1971-1976.
- BROWNELL, R.L. & RALLS, K.; Behavior of melon-headed whales, *Peponocephala electra*, near oceanic islands. In: Baumann-Pickering, S. and Poole, M.M. **Marine Mammal Science**, DOI: 10.1111/j.1748-7692.2009.00281.x.
- BRUMM, H. 2013. Animal Communication and Noise. **Animal Signals and Communication**, 2, Springer Publishing, Berlin, 452p.
- BUCKLAND, S.T.; ANDERSON, D.R.; BURNHAM, K.P. & LAAKE, J.L. 2005. **Distance sampling**. John Wiley & Sons, Ltd.
- BUCKLAND, S.T.; ANDERSON, D.R.; BURNHAM, K.P.; LAAKE, J.L.; BORCHERS, D.L. & THOMAS, L. 2001. **Introduction to Distance Sampling**. Oxford University Press, Oxford.
- BURGEOT, T.; BOCQUÉNÉ, G.; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.; PARRA, L.; PFHOL-LESZKOWICZ, A.; RAOUX, C. & GALGANI, F. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 131, 125-141.
- BURNHAM, K.P. & ANDERSON, D.R. 2002. **Model Selection and Multi-Model Inference**. Springer-Verlag, New York, NY.
- CABALLERO, S.; MARCOS, C.D.O.; SANCHES, A. & MIGNUCCI-GIANNONI,

- A.A. 2013. Initial description of the phylogeography, population structure and genetic diversity of Atlantic spotted dolphins from Brazil and the Caribbean, inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, 48: 263-270.
- CAMACHO, M.; BOADA, L.; OROS, J.; CALABUIG, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. 2012. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Mar. Poll. Bull.** 64, 1974-1980.
- CAMARGO, F.S.; ROLLO-JR, M.M.; GIAMPAOLI, V. & BELLINI, C. 2006. "Whistle variability in South Atlantic spinner dolphins from the Fernando de Noronha Archipelago off Brazil." **J. Acoust. Soc. Am.** 120(6): 9.
- CARVALHO, M.S. & ROSSI-SANTOS, M.R. 2010. Sightings of the bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Trindade Island, Brazil, South Atlantic Ocean. **Marine Biodiversity Records**, 4: 15.
- CASTILHO, C.S.; PEDONE-VALDEZ, F.; BERTUOL, F.; FRUET, P.; GENOVES, R.C.; DI TULLIO, J.C.; CAON, G.; HOFFMANN, L.S. & FREITAS, T.R.O. 2015. Insights about the genetic diversity and population structure of an offshore group of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Mid-Atlantic. **Genetics and Molecular Research**, 14(2): 3387-3399.
- CHEREM, J.J.; SIMÕES-LOPES, P.C.; ALTHOFF, S. & GRAIPEL, M.P. 2004. Lista dos Mamíferos do Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Mastozoología Neotropical**, 11: 151–184.
- CHILDERHOUSE, S.J.; DAWSON, S.W. & SLOOTEN, E. 1995. Abundance and seasonal residence of sperm whales at Kaikoura, New Zealand. **Canadian Journal of Zoology**, 73(4): 723-731.
- CIRANO, M.; MATA, M.M.; CAMPOS, E.J.D. & DEIRÓ, N.F.R. 2006. A Circulação Oceânica de Larga-Escala na Região Oeste do Atlântico Sul com base no Modelo de Circulação Global OCCAM. **Revista Brasileira de Geofísica**, 24(2): 209-230.
- CLAPHAN, P.J. 2000. The Humpback Whale: Seasonal feeding and breeding in a Baleen Whale In: Mann, J., Connor, R.C., Tyack, P.L. & Whitehead, H. **Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whale**, pp.173-196,

- Chicago, University of Chicago Press.
- CLAPHAN, P.J.; BARAFF, L.S.; CARLSON, C.A.; CHRISTIAN M.A.; MATTILA, D.K.; MAYO, C.A.; MURTHY, M.A. & PITTMAN, S. 1993. Seasonal occurrence and annual return of Humpback Whale, *Megaptera novaengiae*, in the southern Gulf of Maine, **Can. J. Zool.** 71: 440-443.
- CLARK, C.W. 1982. The acoustic repertoire of the Southern right whale, a quantitative analysis. **Animal Behaviour**, 30(4): 1060-1071.
- CLARK, C.W.; ELLISON, W.T.; SOUTHALL, B.L.; HATCH, L.; VAN PARIJS, S.M.; FRANKEL, A. & PONIRAKIS D. 2009. Acoustic masking in marine ecosystems: intuitions, analysis, and implication. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 395:201–222.
- CLARKE, M.R.; MARTINS, H.R & PASCOE, P. 1993. The diet of sperm whales (*Physeter macrocephalus* Linnaeus 1758) off the Azores. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 339:67-82.
- CONSTANTINE, R.; JOHNSON, M.; RIEKKOLA, L.; JERVIS, S.; KOZMIAN-LEDWARD, L., DENNIS, T. et al. 2015. Mitigation of vessel-strike mortality of endangered Bryde's whales in the Hauraki Gulf, New Zealand. **Biological Conservation**, 186: 149-157.
- COSTA, A.P.; ROSEL, P.E.; DAURA-JORGE, F.G. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2016. Offshore and coastal common bottlenose dolphins of the western South Atlantic face-to-face: What the skull and the spine can tell us. **Marine Mammal Science**, 32(4), 1433-1457.
- COSTA, A.P.B.; FRUET, P.; DAURA-JORGE, F.G.; SIMÕES-LOPES, P.C.; OTT, P.H.; VALIATI, V.H. & OLIVEIRA, L.R. 2015. Bottlenose dolphin communities from the southern Brazilian coast: do they exchange genes or are they just neighbors? **Marine and Freshwater Research**, doi.org/10.1071/MF14007.
- COX, T.M.; RAGEN, T.J.; READ, A.J.; VOS, E.; BAIRD, R.W., et al. 2006. Understanding the impacts of anthropogenic sound on beaked whales. **Journal of Cetacean Research and Management**, 7: 177-187.
- CRAIG, A.S.; HERMAN, L.M.; PACK, A.A. & WATERMAN, J. O. 2014. Habitat segregation by female humpback whales in Hawaiian waters: Avoidance of males? **Behaviour**, 151(5), 613-631.

- CREMER, M.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2005. The occurrence of *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny) (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine area in southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(3): 717-723.
- CREMER, M.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2008. Distribution, abundance and density estimates of franciscanas, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), in Babitonga bay, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 25: 397-402.
- CREMER, M.J.; BARRETO, A.S.; HARDT, F.A.S.; TONELLO-JR, A.J. & MOUNAYER, R. 2009. Cetacean occurrence near an offshore oil platform in southern Brazil. **Biotemas**, 22(3): 247-251.
- CREMER, M.J.; HARDT, F.A.; TONELLO-JÚNIOR, A.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2011. Distribution and status of the Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) population in Babitonga bay, Southern Brazil. **Zoological Studies**, 50(3), 327-337.
- CREMER, M.J.; HARDT, F.A.S.; TONELLO-JR, A.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2011. Distribution and status of the Guiana Dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) population in Babitonga Bay, southern Brazil. **Zoological Studies**, 50(3): 327-337.
- CREMER, M.J.; HOLZ, A.C.; BORDINO, P.; WELLS, R.S. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2017. Social sounds produced by franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla, Pontoporiidae). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 141(3): 2047-2054.
- CYPRIANO-SOUZA, A.L.; ENGEL, M.H.; CABALLERO, S.; OLAVARRÍA, C.; FLÓREZ-GONZÁLEZ, L.; CAPELLA, J.; STEEL, D.; SREMBBA A.; AGUAYO A.; THIELE, D.; BAKER, C.S. & BONATTO, S.L. 2017. Genetic differentiation between humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Atlantic and Pacific breeding grounds of South America. **Marine Mammal Science**, 33(2): 457-479.
- DA ROCHA, J.M. 1983. Revision of Brazilian whaling data. **Report of the International Whaling Commission** 33: 419-427.
- DALLA-ROSA, L. & SECCHI, E.R. 1997. Stranding of a Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) in Southern Brazil: 'True' or Pygmy? **Report of the International**

Whaling Commission, 47: 425-429.

- DAURA-JORGE, F.G.; INGRAM, S.N. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2013. Seasonal abundance and adult survival of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a community that cooperatively forages with fishermen in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, 29(2), 293-311.
- DAVIS, R.W.; FARGION, G.S.; MAY, N.; LEMING, T.D.; BAUMGARTNER, M.; EVANS, W.E.; HANSEN, L.J. & MULLIN, K. 1998. Physical habitat of cetaceans along the continental slope in the north-central and western Gulf of Mexico. **Marine Mammal Science**, 14(3): 490-507.
- DAVIS, R.W.; JAQUET, N.; GENDRON, D.; MARKAIDA, U.; BAZZINO, G. & GILLY, W. 2007. Diving behavior of sperm whales in relation to behavior of a major prey species, the jumbo squid, in the Gulf of California, Mexico. **Marine Ecology Progress Series** 333: 291-302.
- DAWSON, S.; BARLOW, J. & LJUNGBLAD, D. 1998. Sounds recorded from baird's beaked whale, *berardius bairdii*. **Marine Mammal Science**, 14(2), 335-344.
- DE-ROBERTIS, A.; MCKELVEY, D.R. & RESSLER, P.H. 2010. Development and application of an empirical multifrequency method for backscatter classification. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 67(9): 1459-1474.
- DING, W.; WÜRSIG, B. & EVANS, W. 1995. Comparisons of whistles among seven odontocete species. In: KASTELEIN, R. A.; THOMAS, J. A.; NACHTIGALL, P. E. (Eds.), **Sensory systems of aquatic mammals** (pp. 299-323). Woerden, The Netherlands: DeSpil Publishers.
- DI-TULLIO, J.C.; GANDRA, T.B.R.; ZERBINI, A.N. & SECCHI, E.R. 2016. Diversity and distribution patterns of cetaceans in the Subtropical Southwestern Atlantic outer continental shelf and slope. **PLoS One**, 11(5): e0155841.
- DOMBROSKI, J.R.G.; PARKS, S.E.; GROCH, K.R.; FLORES, P.A.C. & SOUSA-LIMA, R.S. 2016. Vocalizations produced by southern right whale (*Eubalaena australis*) mother-calf pairs in a calving ground off Brazil. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 140(3): 1850-1857.

- DROUOT, V. & GANNIER, A. 2007. Movements of sperm whale in the western Mediterranean Sea: preliminary photo-identification results. **J. Mar. Biol. Assoc. UK** 87: 195-200.
- DUNLOP, R.; CATO, D.H. & NOAD, M.J. 2010. Your attention please: increasing ambient noise levels elicits a change in communication behavior in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Proceedings of the Royal Society B**, 277: 2521-2529.
- ENGEL, M.H. & MARTIN, A.R. 2009. Feeding grounds of the western South Atlantic humpback whale population. **Marine Mammal Science**, 25: 964–969.
- ERBS, F.; ELWEN, S.H. & GRIDLEY, T. 2017. Automatic classification of whistles from coastal dolphins of the southern African subregion. **Journal of Acoustical Society of America**, 101(4): 2489–2500.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Lynx and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10:564-567.
- FAIR, P.; ADAMS, J.; MITCHUM, G.; HULSEY, T.; REIF, J.; HOUDE, M.; MUIR, D.; WIRTH, E.; WETZEL, D.; ZOLMAN, E.; MCFEE, W. & BOSSART, G. 2010. Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: Concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. **Sci. Total Environ.** 408, 1577–1597.
- FERGUSON, S.H.; KINGSLEY, M.C.S. & HIGDON, J.W. 2011. Killer whale (*Orcinus orca*) predation in a multi-prey system. **Population Ecology**, 54(1): 31-41.
- FIGUEIREDO, L.D.; TARDIN, R.H.; LODI, L.; MACIEL, I.S.; ALVES, M.A.S. & SIMÃO, S.M. 2014. Site fidelity of Bryde’s whales (*Balaenoptera edeni*) in Cabo Frio region, southeastern Brazil, through photoidentification technique. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology** 18(2): 59-64.
- FLACH, L.; FLACH, P.A. & CHIARELLO, A.G. 2008. Density, abundance and distribution of the Guiana dolphin, (*Sotalia guianensis* van Benédén, 1864) in Sepetiba Bay, Southeast Brazil. **Journal of Cetacean Research and Management**, 10(1): 31-36.

- FORMIGARO C.; HENRIQUEZ-HERNANDEZ L.; ZACCARONI A.; GARCIA-HARTMANN M.; CAMACHO M. & BOADA L. 2014. Assessment of current dietary intake of organochlorine contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons in killer whales (*Orcinus orca*) through direct determination in a group of whales in captivity. **Sci. Total Environ.** 472, 1044–1051.
- FREITAS, C.; LYDERSEN, C.; FEDAK, M. & KOVACS, K.M. 2008. A simple new algorithm to filter marine mammal Argos locations. **Marine Mammal Science**, 24, 315–325.
- FRIEDLAENDER, A.S.; GOLDBOGEN, J.A.; NOWACEK, D.P.; READ, A.J.; JOHNSTON, D. & GALES, N. 2014. Feeding rates and under-ice foraging strategies of the smallest lunge filter feeder, the Antarctic minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*). **The Journal of Experimental Biology** 217: 2851-2854.
- FRIEDLAENDER, A.S.; HAZEN, E.L.; NOWACEK, D.P.; HALPIN, P.N.; WARE, C.; WEINRICH, M.T. et al. 2009. Diel changes in humpback whale *Megaptera novaeangliae* feeding behavior in response to sand lance *Ammodytes* spp. behavior and distribution. **Marine Ecology-Progress Series**, 395: 91-100.
- FRUET, P.F. et al. 2014. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. **Conservation Genetics**, 15(4), 879-895.
- FRUET, P.F.; SECCHI, E.R.; DI TULLIO, J.C. & KINAS, P.G. 2011. Abundance of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Cetacea: Delphinidae), inhabiting the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: Implications for conservation. **Zoologia** 28(1): 23-30.
- GADAGBUI, B. & GOKSOYR, A. 1996. CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta River (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*). **Biomarkers**. 1, 252–261.
- GALES, N.; BOWERS, M.; DURBAN, J.W.; FRIEDLAENDER, A.S.; NOWACEK, D.P.; PITMAN, R.L.; READ, A.J. & TYSON, R.B. 2014. **Advances in non-lethal research on Antarctic minke-whales**: biotelemetry, photo-identification

- and biopsy sampling. SC/65a/IA12.
- GALES, N.J.; KASUYA, T.; CLAPHAM, P.J. & BROWNELL, R.L. 2005. Japan's whaling plan under scrutiny. **Nature** 435, 883-884
- GARCÍA-ÁLVAREZ, N.; BOADA, L.; FERNÁNDEZ A.; ZUMBADO, M.; ARBELO, M.; SIERRA, E.; XURIACH, A.; ALMUNIA, J.; CAMACHO, M. & LUZARDO, L. 2014. Assessment of the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Eastern Atlantic Ocean. **Mar. Environ. Res.**, 100, 48-56.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, N.; MARTÍN, V.; FERNÁNDEZ, A.; ALMUNIA, J.; XURIACHA, A.; ARBELO, M.; TEJEDOR, M.; BOADA, L.; ZUMBADO, M. & LUZARDO, O. 2014. Levels and profiles of POPs (organochlorine pesticides, PCBs, and PAHs) in free-ranging common bottlenose dolphins of the Canary Islands, Spain. **Sci. Total Environ.** 493, 22–31.
- GARRISON, T. 2010a. Plancton, Algae and Plants. In: Oceanography: An Invitation to Marine Science. 7th Ed. Edited by GARRISON, T. Belmont. Brooks/Cole, Cengage Learning. pp.391-399. **ISBN-13:** 978-0- 495-39193-7;
- GARRISON, T. 2010b. Circulation of the Ocean. In: Oceanography: An Invitation to Marine Science. 7th Ed. Edited by GARRISON, T. Belmont. Brooks/Cole, **Cengage Learning**. pp.247-250. **ISBN-13:** 978-0- 495-39193-7.
- GASPARINI, J.L. & SAZIMA, I.A. 1996. A stranded melonheaded whale, *Peponocephala electra*, in southeastern Brazil, with comments on wounds from the cookiecutter shark, *Isistius brasiliensis*. **Marine Mammal Science** 12:308-312.
- GERACI, J.R.; HICKS, B.D.H. & ST-AUBIN, D.J. 1979. Dolphin pox: a skin disease of cetaceans. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, 43(4), 399.
- GERO, S.; WHITEHEAD, H. & RENDELL, L. 2016. Individual, unit and vocal clan level identity cues in sperm whale codas. *Royal Society Open Science*, 3(1), 150372. <http://doi.org/10.1098/rsos.150372>.
- GERRODETTE, T. 1987. A power analysis for detecting trends. **Ecology**, 68: 1364-1372.
- GILLESPIE, D.; DUNN, C.; GORDON, J.; CLARIDGE, D.; EMBLING, C. & BOYD,

- I. 2009. Field recordings of Gervais' beaked whales *Mesoplodon europaeus* from the Bahamas. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 125(5): 3428-3433.
- GILLESPIE, D.; GORDON, J.; MCHUGH, R.; MCLAREN, D.; MELLINGER, D.K.; REDMOND, P.; THODE, A.; TRINDER, P. & XIAO, D. 2008. Pamguard: Semi automated, open-source software for real-time acoustic detection and localization of cetaceans. *Proceed. Instit. Acoust.* 30, Part 5. 9 pp.
- GOKSOYR, A. & FORLIN, L. 1992. The cytochrome-P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.** 22, 287–311.
- GOLDBOGEN, J.A. 2006. Kinematics of foraging dives and lunge-feeding in fin whales. **Journal of Experimental Biology**, 209(7): 1231-1244.
- GOLDBOGEN, J.A.; FRIEDLAENDER, A.S.; CALAMBOKIDIS, J.; MCKENNA, M.F.; SIMON, M. & NOWACEK, D.P. 2013. Integrative Approaches to the Study of Baleen Whale Diving Behavior, Feeding Performance, and Foraging Ecology. **BioScience**, 63(2): 90-100.
- GOLDBOGEN, J.A.; PYENSON, N.D. & SHADWICK, R.E. 2007. Big gulps require high drag for fin whale lunge feeding. **Marine Ecology-Progress Series**, 349: 289-301.
- GOLEY, P.D. & STRALEY, J.M. 1994. Attack on grey whales in Monterrey Bay, California, by killer whales previously identified in Glacier Bay, Alaska. **Can. J. Zool.**, v. 72, n. 8, p. 1528-1530.
- GONÇALVES, L.R. & ANDRIOLO, A. 2006. Ocorrência, distribuição e comportamento de baleias-de-Bryde (*Balaenoptera edeni* Anderson, 1879) (Cetacea, Mysticeti) em áreas costeiras e oceânicas do sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 8(2), 213.
- GOOLD, J.C. 1999. Behavioural and acoustic observations of sperm whales in Scapa Flow, Orkney Islands. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 79(3): 541-550.
- GREEN, M.L.; HERZING, D.L. & BALDWIN, J.D. 2011. Reproductive success of male Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*) revealed by noninvasive genetic analysis of paternity. **Canadian Journal of Zoology**, 89(3): 239-253.
- HAIMOVICI, M.; DOS-SANTOS, R.A.; BAINY, M.C.; FISCHER, L.G., &

- CARDOSO, L.G. 2014. Abundance, distribution and population dynamics of the short fin squid *Illex argentinus* in Southeastern and Southern Brazil. **Fisheries Research**, 152: 1-12.
- HANSON, M.; BAIRD, R.; FORD, J.; HEMPELMANN-HALOS, J.; VAN DOORNIK, D.; CANDY, J. et al. 2010. Species and stock identification of prey consumed by endangered southern resident killer whales in their summer range. **Endangered Species Research**, 11(1): 69-82.
- HARDT, F.A.S.; CREMER, M.J.; TONELLO-JR, A.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2010. Residence patterns of the Guiana dolphin *Sotalia guianensis* in Babitonga Bay, south coast of Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 8(1-2), 117-121.
- HASTIE, G. D., WILSON, B., THOMPSON, P. M. 2006. Diving deep in a foraging hotspot: acoustic insights into bottlenose dolphin dive depths and feeding behavior. **Marine Biology** 148: 1182-1188.
- HASTIE, G.D.; SWIFT, R.J.; GORDON, J.C.; SLESSER, G. & TURRELL, W.R. 2003. Sperm whale distribution and seasonal density in the Faroe Shetland Channel. **Journal of Cetacean Research and Management**, 5(3), 247-252.
- HAUSER, N.; ZERBINI, A.N.; GEYER, Y.; HEIDE-JORGENSEN, M.P. & CLAPHAM, P. 2010. Movements of satellite-monitored humpback whales, *Megaptera novaengliae*, from the Cook Island. **Marine Mammal Science** DOI: 10.1111/j.1748-7692.2009.00363.x.
- HAZEN, E.L.; FRIEDLAENDER, A.S. & THOMPSON, M.A. 2009. Fine-scale prey aggregations and foraging ecology of humpback whales *Megaptera novaeangliae*. **Marine Ecology Progress Series**, 395: 75-89.
- HEIMLICH, S.L.; MELLINGER, D.K. & NIEUKIRK, S.L. 2005. Types, distribution, and seasonal occurrence of sounds attributed to Bryde's whales (*Balaenoptera edeni*) recorded in the eastern tropical Pacific, 1999-2001. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 118(3):1830.
- HELLOU, J.; STENSON, G.; NI, L. & PAYNE, J. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle tissue of marine mammals from the northwest Atlantic. **Mar. Poll. Bull.** 21, 135-40.
- HILDEBRAND, J.A.; BAUMANN-PICKERING, S.; FRASIER, K.E.; TRICKEY, J.S.;

- MERKENS, K.P.; WIGGINS, S.M. & THOMAS, L. 2015. Passive acoustic monitoring of beaked whale densities in the Gulf of Mexico. **Scientific reports**, 5: 16343.
- HODGE, L.E.; BAUMANN-PICKERING, S.; HILDEBRAND, J.A.; BELL, J.T.; CUMMINGS, E.W.; FOLEY, H.J.; MCALARNEY, R.J.; MCLELLAN, W.A.; PABST, D.A.; SWAIM, Z.T.; WAPLES, D.M. & READ, A.J. 2018. **Marine Mammal Science**. doi: 10.1111/mms.12498.
- HOELZEL, A.R.; GOLDSWORTHY, S.D. & FLEISCHER, R.C. 2002. Population genetic structure. **Marine mammal biology: an evolutionary approach**, 325-352.
- HOOKER, S.K. & WHITEHEAD, H. 2002. Click characteristics of northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*). **Marine Mammal Science**, 18(1): 69-80.
- HORWOOD, J. (ed) 1987. The sei whale: population biology, ecology & management. Croom Helm, London IWC. 2006. **Report of the workshop on the comprehensive assessment of Southern Hemisphere humpback whales**. Paper SC/58/Rep 5 presented to the IWC Scientific Committee.
- HU, C.; LEE, Z. & FRANZ, B. 2012. Chlorophyll algorithms for oligotrophic oceans: A novel approach based on three-band reflectance difference. **Journal of Geophysical Research**, 117(C1).
- IRVINE, L.; PALACIOS, D.M.; URBÁN, J. & MATE, B. 2017. Sperm whale dive behavior characteristics derived from intermediate-duration archival tag data. **Ecol. Evol.**, 7(19): 7822 – 7837.
- IUCN. 2018. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2018-2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 05 Jul. 2018.
- JANIK, V.M., & SAYIGH, L.S. 2013. Communication in bottlenose dolphins: 50 years of signature whistle research. **Journal of Comparative Physiology A**, 199, 479-489.
- JAUQUET, N. & WHITEHEAD, H. 1996. Scale-dependent correlation of sperm whale distribution with environmental features and productivity in the South Pacific. **Marine Ecology Progress Series**, 1-9.
- JAUQUET, N.; DAWSON, S. & DOUGLAS, L. 2001. Vocal behavior of male sperm

- whales: Why do they click? **The Journal of the Acoustical Society of America**, 109(5): 2254-2259.
- JARVIS, S.; DIMARZIO, N.; MORRISSEY, R. & DAVID-MORETTI, D. 2008. A novel multi-class support vector machine classifier for automated classification of beaked whales and other small odontocetes. **Canadian Acoustics**, 36(1): 36-40.
- JEFFERSON, T.; WEBBER, M. & PITMAN, R. 2015. **Marine mammals of the world**. A comprehensive guide to their identification. Cambridge: Academic Press, 616p.
- JIMENEZ, B. & STEGEMAN, J. 1990. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. **Ann. Fish. Soc. Symp.** 8, 67-79.
- JOHNSON, M.; AGUILAR-SOTO, N. & MADSEN, P.T. 2009. Studying the behaviour and sensory ecology of marine mammals using acoustic recording tags: a review. **Marine Ecology-Progress Series**, 395, 55–73. <http://doi.org/10.3354/meps08255>
- JOHNSON, M.; MADSEN, P.T.; ZIMMER, W.M.; AGUILAR-SOTO, N. & TYACK, P.L. 2004. Beaked whales echolocate on prey. **Proceedings of the Royal Society of Lond. B**, 271(6): S383-S386.
- JOHNSON, M.; MADSEN, P.T.; ZIMMER, W.M.X.; AGUILAR-SOTO, N. & TYACK, P.L. 2006. Foraging Blainville's beaked whales (*Mesoplodon densirostris*) produce distinct click types matched to different phases of echolocation. **Journal of Experimental Biology**, 209(24): 5038-5050.
- JOHNSON, M.P. & TYACK, P.L. 2003. A digital acoustic recording tag for measuring the response of wild marine mammals to sound. **IEEE Journal of Oceanic Engineering**, 28(1): 3-12.
- JONSEN, I. 2016. Joint estimation over multiple individuals improves behavioral state inference from animal movement data. **Scientific Reports**, 6: 20625.
- JONSEN, I.; FLEMMING, J.M. & MYERS R.A. 2005. Robust state-space modeling of animal movement data. **Ecology**, 86(11): 2874-2880.
- JOYCE, G.G. 1990. Radio tracking a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) in Icelandic waters for the examination of dive-time patterns. **Report International Whaling Commission** 40: 357-361.

- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L. & MARSHALL, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16:1099-1106.
- KANG, M.; FURUSAWA, M. & MIYASHITA, K. 2002. Effective and accurate use of difference in mean volume backscattering strength to identify fish and plankton. **ICES Journal of Marine Science**, 59(4): 794-804.
- KATO, H. & PERRIN W.F. 2008. **Bryde's whales *Balaenoptera edeni* and *B. brydei***. In Perrin, W.F.: Würsig, B. & Thewissen, J.G.M. (Eds.) Encyclopedia of marine mammals. 2nd edition. San Diego, Academic Press, 158-163 pp.
- KATONA, S.K. & WHITEHEAD, H.P. 1981. Identifying humpback whales using their natural markings. **Polar Record**, 20(128), 439-444.
- KINZEY, D. & GERRODETTE, T. 2001. Conversion factors for binocular reticles. **Marine Mammals Science**, 17(2): 353-361.
- KLATSKY, L.J.; WELLS, R.S.; SWEENEY, J.C. 2007. Offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): movement and dive behavior near the Bermuda Pedestal. **Journal of Mammalogy** 88 (1): 59-66.
- KUCKLICK, J.; SCHWACKE, L.; WELLS, R.; HOHN, A.; GUICHARD, A.; YORDY, J.; HANSEN, L.; ZOLMAN, E.; WILSON, R.; LITZ, J.; NOWACEK, D.; ROWLES, T.; PUGH, R.; BALMER, B.; SINCLAIR, C. & ROSEL, P. 2011. Bottlenose dolphins as indicators of persistent organic pollutants in the western North Atlantic Ocean and northern Gulf of Mexico. **Environ. Sci. Technol.** 45 (10), 4270-7.
- KUEHL, D.W.; HAEBLER, R. & POTTER, C. 1991. Chemical residues in dolphins from the United States Atlantic coast including Atlantic bottlenose obtained during the 1987/88 mass mortality. **Chemosphere**. 22, 1071-84.
- KYHN, L.A.; TOUGAARD, J.; THOMAS, L.; DUVE, L.S.; STENBACK, J.; AMUDIN, M.; DESPORTES, G. & TEILMANN, J. 2012. From echolocation clicks to animal density-Acoustic sampling of harbor porpoises with static dataloggers. **Journal of Acoustical Society of America**, 131(1): 550-560.
- LAMMERS, M.O., & AU, W.W.L. 2003. Directionality in the whistles of Hawaiian spinner dolphins (*Stenella longirostris*): A signal feature to cue direction of movement? **Marine Mammal Science**, 19, 249-264.

- LAMMERS, M.O.; AU, W.W.L. & HERZING, D.L. 2003. The broad band social acoustic signaling behavior of spinner and spotted dolphins. **J. Acoust. Soc. Am.** 114(3): 11-17.
- LARKMAN, V. & VEIT, R. 1998. Seasonality and abundance of blue whales of southern California. **CalCOFI Rep.** 39:236-239.
- LEARMONTH, J.A.; MACLEOD, C.D.; SANTOS, M.B.; PIERCE, G.J.; CRICK, H.Q.P. & ROBINSON, R.A. 2006. Potential Effects of Climate Change on Marine Mammals. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44:431-464;
- LEATHERWOOD, S. & REEVES, R.R. 1983. **The Sierra Club handbook of whales and dolphins**. San Francisco: Sierra Club Books.
- LEDUC, R.G.; DIZON, A.E.; GOTO, M.; PASTENE, L.A.; KATO, H.; NISHIWAKI, S.; LEDUC, C.A. & BROWNELL R.L. 2007. Patterns of genetic variation in Southern Hemisphere blue whales and the use of assignment test to detect mixing on the feeding grounds. **Journal of Cetacean Research and Management**, 9: 73-80.
- LEE, J.F.; FRIEDLAENDER, A.S.; OLIVER, M.J. & DELIBERTY, T.L. 2017. Behavior of satellite-tracked Antarctic minke whales (*Balaenoptera boanerensis*) in relation to environment factors around the western Antarctic Peninsula. **Animal Biotelemetry** 5: DOI 10.1186/s40317-017-0138-7
- LERCZAK, JA. & HOBBS, R.C. 1998. Calculating sighting distances from angular readings during shipboard, aerial, and shore-based marine mammal surveys. **Marine Mammal Science**, 14(3): 590-599.
- LETTEVALL, E.; RICHTER, C.; JAQUET, N.; SLOOTEN, E.; DAWSON, S.; WHITEHEAD, H.; CHRISTAL, J. & HOWARD, P.M. 2016. Social structure and residence in aggregations of male sperm whales. **Canadian Journal of Zoology**, DOI: 10.1139/z02-102
- LEWIS, T.; GILLESPIE, D.; LACEY, C.; MATTHEWS, J.; DANBOLT, M.; LEAPER, R.; MCLANAGHAN, R. & MOSCROP, A. 2007. Sperm whale abundance estimates from acoustic surveys of the Ionian Sea and Straits of Sicily in 2003. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 87(01): 353-357.

- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25:1451-1452.
- LIMA, A.F.B.; GONÇALVES, L.R.; QUEIROZ, E.L. 2006. Registro histórico de encaixe de uma baleia-de-Bryde *Balaenoptera edeni* Anderson, 1879 (Mysticeti: Balaenopteridae), no rio Paraguaçu, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Bioikos** 20(2): 75-59.
- LODI, L. & BOROBIA, M. 2013. **Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora.
- LODI, L. & FARIAS-JÚNIOR, S. 2011. Movements of a solitary adult male killer whale, *Orcinus orca* (Cetacea, Delphinidae), along the coast of south-eastern Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 6(4): 325-328
- LODI, L. & HETZEL, B. 1998. *Orcinus orca* (Cetacea; Delphinidae) em águas costeiras do Estado do Rio de Janeiro [*Orcinus orca* (Cetacea; Delphinidae) in coastal waters of Rio de Janeiro State]. **Bioikos**, 12: 46-54.
- LODI, L. & HETZEL, B. 1999. Rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, feeding behaviors in Ilha Grande bay. **Biociências**, 7(1), 29-42.
- LODI, L.; CANTOR, M.; DAURA-JORGE, F.G. & MONTEIRO-NETO, C. 2014. A missing piece from a bigger puzzle: declining occurrence of a transient group of bottlenose dolphins off Southeastern Brazil. **Marine Ecology**, 35(4), 516-527.
- LODI, L.; OLIVEIRA, R.H.T.; FIGUEIREDO, L.D. & SIMÃO, S.M. 2012. Movements of the rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*) in Rio de Janeiro State, southeastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, 5.
- LODI, L.; SICILIANO, S. & CAPISTRANO, L. 1990. Mass stranding of *Peponocephala electra* (Cetacea, Globicephalinae) on Piracanga beach, Bahia, Northeastern Brazil. **Scientific Reports of Cetacean Research** 1: 79-84.
- LODI, L.; TARDIN, R.H.; HETZEL, B.; MACIEL, I.S.; FIGUEIREDO, L.D. & SIMÃO, S.M. 2015. Bryde's whale (Cetartiodactyla: Balaenopteridae) occurrence and movements in coastal areas of southeastern Brazil. **Zoologia**, 32(2), 171-175.

- LODI, L.; WEDEKIN, L.L.; ROSSI-SANTOS, M.R. & MARCONDES, M. C. 2008. Movements of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Rio de Janeiro state, southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, 9: 205–209.
- LOUIS, M.; VIRICEL, A.; LUCAS, T.; PELTIER, H.; ALFONSI, E.; BERROW, S. & STEPHANIS, R. 2014. Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. **Molecular Ecology**, 23(4): 857-874.
- LOWTHER-THIELEKING, J.L.; ARCHER, F.I.; LANG, A.R. & WELLER, D.W. 2015. Genetic differentiation among coastal and offshore common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the eastern North Pacific Ocean. **Marine Mammal Science**, 31(1): 1-20.
- LUCENA, A. 2006. Estrutura populacional da *Balaenoptera bonaerensis* (Burmeister) (Cetácea, Balaenopteridae) nas áreas de reprodução do Atlântico Sul. **Revista Brasileira de Zoologia** 23 (1): 176-185.
- MACLEOD, C. D.; PERRIN, W. F.; PITMAN, R.; BARLOW, J.; BALLANCE, L.D.; AMICO, A.; GERRODETE, T.; JOYCE, G.; MULLIN, K.D.; PALKA, D.E. & WARING, G.T. 2005. Known and inferred distributions of beaked whale species (Cetacea: Ziphiidae). **Journal of Cetacean Research and Management**, 7(3): 271.
- MADSEN, P.; WAHLBERG, M. & MØHL, B. 2002. Male sperm whale (*Physeter macrocephalus*) acoustics in a high-latitude habitat: implications for echolocation and communication. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 53(1): 31-4.
- MADSEN, P.T. & SURLYKKE, A. 2013. Functional convergence in bat and toothed whale biosonars. **Physiology**, 28(5): 276-283.
- MADSEN, P.T. & WAHLBERG, M. 2007. Recording and quantification of ultrasonic echolocation clicks from free-ranging toothed whales. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, 54(8): 1421-1444.
- MADSEN, P.T., AGUILAR-SOTO, N.; TYACK, P.L., & JOHNSON, M. 2014. Beaked whales. **Current Biology**, 24(16): R728-R730.
- MADSEN, P.T.; CARDER, D.A.; BEDHOLM, K. & RIDGWAY, S.H. 2005. Porpoise clicks from a sperm whale nose: Convergent evolution of 130 kHz pulses in

- toothed whale sonars? **Bioacoustics**, 15(2): 195-206.
- MADSEN, P.T.; KERR, I. & PAYNE, R. 2004a. Echolocation clicks of two free-ranging, oceanic delphinids with different food preferences: false killer whales *Pseudorca crassidens* and Risso's dolphins *Grampus griseus*. **Journal of Experimental Biology**, 207(11): 1811-1823.
- MADSEN, P.T.; KERR, I. & PAYNE, R. 2004b. Source parameter estimates of echolocation clicks from wild pygmy killer whales (*Feresa attenuata*) (L). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 116(4): 1909-1912.
- MADUREIRA, L.S.; EVERSON, I. & MURPHY, E.J. 1993. Interpretation of acoustic data at two frequencies to discriminate between Antarctic krill (*Euphausia superba*) and other scatterers. **Journal of Plankton Research**, 15(7): 787-802.
- MANN, J. 1999. Behavioral sampling methods for cetaceans: a review and critique. **Marine mammal science**, 15(1), 102-122.
- MARCOUX, M.; WHITEHEAD, H. & RENDELL, L. 2006. Coda vocalizations recorded in breeding areas are almost entirely produced by mature female sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Canadian Journal of Zoology**, 84(4): 609-614.
- MARQUES, F.F.C. & BUCKLAND, S.T. 2004. Covariate models for the detection function. In: **Advanced Distance Sampling** (Eds.: Buckland, S.T., Anderson, D.R., Burnham, K.P., Laake, J.L., Borchers, D.L. & Thomas, L.). Pp. 31-47. Oxford University Press, Oxford.
- MARQUES, T.A.; MUNGER, L.; THOMAS, L.; WIGGINS, S. & HILDEBRAND, J.A. 2011. Estimating North Pacific right whale *Eubalaena japonica* density using passive acoustic cue counting. **Endangered Species Research**, 13(3), 163-172.
- MARQUES, T.A.; THOMAS, L.; STEPHEN W.; MARTIN, S.W.; MELLINGER, D.K.; WARD, J.A.; MORETTI, D.J.; HARRIS, D. & TYACK, P.L. 2013. Estimating animal population density using passive acoustics. **Biological Reviews**, 88: 287- 309.
- MARQUES, T.A.; THOMAS, L.; WARD, J.; DIMARZIO, N. & TYACK, P. L. 2009. Estimating cetacean population density using fixed passive acoustic sensors:

- an example with Blainville's beaked whales. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 125(4): 1982-1994.
- MARSILI, L., CARUSO, A., FOSSI, M., ZANARDELLI, M., POLITI, E., FOCARDI, S. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. **Chemosphere**. 44, 147-154.
- MARTEN, K. 2000. Ultrasonic analysis of pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) and Hubbs' beaked whale (*Mesoplodon carlhubbsi*) clicks. **Aquatic Mammals**, 26(1): 45-48.
- MARTINS, A.M.; ALVES-JR, T.J.; NETO, M.F. & LIEN, J. 2004. The most northern record of Gervais' beaked whale, *Mesoplodon europaeus* (Gervais, 1855), for the Southern Hemisphere. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 3(2): 151-155.
- MASSONE, C.; WAGENER, A.; ABREU, H. & GIODA, A. 2015. Hydrocarbon concentration and source appraisal in atmospheric particulate matter (PM_{2.5}) of an urban tropical area. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 14767–14780.
- MATKIN, C.O.; MATKIN, D.R.; ELLIS, G.M.; SAULITIS, E. & MCSWEENEY, D. 1997. Movements of resident killer whales in Southeastern Alaska and Prince William Sound, Alaska. **Marine Mammal Science**, 13 (2): 469-475.
- MATSUURA, Y. 1995. Exploração pesqueira-ambiente marinho no litoral brasileiro:1-15 in MMA, 1995. Os ecossistemas brasileiros e os principais macrovetores de desenvolvimento: subsídios ao planejamento da gestão ambiental/Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Secretaria de Coordenação dos Assuntos de Meio Ambiente, Programa Nacional do Meio Ambiente - **PNMA** - Brasília:104p.
- MATTHEWS, J.N.; RENDELL, L.E.; GORDON, J.C.D. & MACDONALD, D.W. 1999. A review of frequency and time parameters of cetacean tonal calls. **Bioacoustics** 10: 47-71.
- MATTHIOPOULOS, J. & ARTS, G. 2010. The spatial analysis of marine mammal abundance. In: **Marine Mammal Ecology and Conservation: a handbook of techniques** (Eds.: Boyd, I.L., Don Bowen, W. & Iverson, S.J.). Pp. 68-97. Oxford University Press, Oxford.
- MAUAD, C., WAGENER, A., MASSONE, C., ANICETO, N., LAZZARI, L.,

- CARREIRA, R., FARIAS, C. 2015. Urban rivers as conveyors of hydrocarbons to sediments of estuarine areas: source characterization, flow rates and mass accumulation. **Sci. Total Environ.** 506-507, 656–666
- MAY-COLLADO, L.J. & WARTZOK, D. 2009. A characterization of Guyana dolphin (*Sotalia guianensis*) whistles from Costa Rica: The importance of broad band recording systems. **Acoust. Soc. Am.** 125 (2): 1202 –1213.
- MAY-COLLADO, L.J. & WARTZOK, D. 2014. A comparison of bottle nose dolphin whistles in the Atlantic Ocean: factors promoting whistle variation. **Journal of Mammalogy**, 89(5): 1229–1240.
- MAY-COLLADO, L.J.; AGNARSSON, I. & WARTZOK, D. 2007. Phylogenetic review of tonal sound production in whales in relation to sociality. **BMC Evolutionary Biology**, 7, 136.
- MAZARIS, A.D.; KALLIMANIS, A.S.; CHATZIGIANIDIS, G.; PAPADIMITRIOU, K.; PANTIS, J.D. 2009. Spatio-temporal analysis of an acoustic environment: interactions between landscape features and sounds. **Land Ecol.**, 24(6):817–831.
- MCCULLAGH, P. & NELDER, J.A. 1989. **Generalized Linear Models**. 2nd edition. Monographs on Statistics and Applied Probability 37. Chapman & Hall, London.
- MCFADDEN, G. 2005. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, 3(3), 201-213.
- MELCÓN, M.L.; MAURICIO, F. & INIGUEZ, M.A. 2012. Echolocation behavior of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in the wild. **Journal of the Acoustical Society of America**, 131(6).
- MELERO, M.; CRESPO-PICAZO, J.L.; RUBIO-GUERRI, C.; GARCÍA-PÁRRAGA, D. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. 2015. First molecular determination of herpesvirus from two mysticete species stranded in the Mediterranean Sea. **BMC veterinary research**, 11(1), 283.
- MELLINGER D.K. & CLARK C.W. 2000. Recognizing transient low-frequency whale sounds by spectrogram correlation. **Journal of the Acoustical Society of America**. 107: 3518–3529.
- MELLINGER, D.K.; MARTIN, S.W.; MORRISSEY, R.P.; THOMAS, L. & YOSKO,

- J.J. 2011. A method for detecting whistles, moans, and other frequency contour sounds. **Journal of Acoustical Society of America**, 129(6): 4055–4061.
- MELLINGER, D.K.; STAFFORD, K.M.; MOORE, S.E.; MUNGER, L. & FOX, C.G. 2004. Detection of North Pacific right whale (*Eubalaena japonica*) calls in the Gulf of Alaska. **Marine Mammal Science**, 20: 872–879.
- MERCADO, E.; & FRAZER, L.N. 1999. Environmental constraints on sound transmission by humpback whales. **Journal of the Acoustical Society of America**, 106, 3004-3016.
- MERKENS, K.; BARKLEY, Y.; HILL, M. & OLESON, E. 2016. Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) echolocation clicks from Guam (Western North Pacific Ocean). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 140(4): 3415-3415.
- MERKENS, K.; MANN, D.; JANIK, V.M.; CLARIDGE, D.; HILL, M. & OLESON, E. 2018. Clicks of dwarf sperm whales (*Kogia sima*). **Marine Mammal Science** doi: 10.1111/mms.12488.
- MILLER, D.L.; BURT, M.L.; REXSTAD, E.A. & THOMAS, L. 2013. Spatial models for distance sampling data: recent developments and future directions. **Methods in Ecology and Evolution**, 4(11): 1001-1010.
- MILLER, P.J.; JOHNSON, M.P. & TYACK, P.L. 2004. Sperm whale behavior indicates the use of echolocation click buzzes ‘creaks’ in prey capture. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 271(1554): 2239-2247.
- MILLER, P.J.O.; AOKI, K.; RENDELL, L.E. & AMANO, M. 2008. Stereotypical resting behavior of the sperm whale. **Current Biology**, 18(1): R21 -R23.
- MILLER, P.J.O.; JOHNSON, M.P.; TYACK, P.L. & TERRAY, E.A. 2004. Swimming gaits, passive drag and buoyancy of diving sperm whales *Physeter macrocephalus*. **Journal of Experimental Biology**, 207(11): 1953-1967.
- MILLER, P.J.O.; SHAPIRO, A.D.; DEECKE, V.B. 2010. The diving behavior of mammal-eating killer whales (*Orcinus orca*): variations with ecological not physiological factors. **Canadian Journal of Zoology** 88: 1103-1112.
- MIRIMIN, L.; WESTGATE, A.; ROGAN, E.; ROSEL, P.; READ, A.; COUGHLAN, J. & CROSS, T. 2009. Population structure of short-beaked common dolphins

- (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. **Marine biology**, 156(5): 1087-1087.
- MMA. 2014. Portaria No. 444, de 17 de dezembro de 2014. Ministério do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, 245 (Seção 1): 121-126.
- MØHL, B. 2001. Sound transmission in the nose of the sperm whale *Physeter catodon*. A post mortem study. **Journal of Comparative Physiology A**: 187(5): 335-340.
- MØHL, B.; WAHLBERG, M.; MADSEN, P.T.; HEERFORDT, A. & LUND, A. 2003. The monopulsed nature of sperm whale clicks. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 114(2): 1143-1154.
- MØHL, B.; WAHLBERG, M.; MADSEN, P.T.; MILLER, L.A. & SURLYKKE, A. 2000. Sperm whale clicks: Directionality and source level revisited. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 107(1): 638-648.
- MÖLLER, L.; SIMÕES-LOPES, P.C.; SECCHI, E.R. & ZERBINI, A.N. 1994. Uso de fotoidentificação no estudo do deslocamento de botos, *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) na costa sul do Brasil. **6ª Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Marinhos da América do Sul**. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. p. 5-8
- MORETE, M.E.; BISI, T.L.; PACE, R.M. & ROSSO, S. 2008. Fluctuating abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in a calving ground off coastal Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the U.K**, 88:1229-1235.
- MORIN, P.A.; SCOTT BAKER, C.; BREWER, R.S.; BURDIN, A.M.; DALEBOUT, M.L.; DINES, J.P.; FEDUTIN, I.; FILATOVA, O.; HOYT, E.; JUNG, J.; LAUF, M.; POTTER, C.W.; RICHARD, G.; RIDGWAY, M.; ROBERTSON, K.M. & WADE, P.R. 2017. Genetic structure of the beaked whale genus *Berardius* in the North Pacific, with genetic evidence for a new species. **Marine Mammal Science**, 33: 96-111. doi: 10.1111/mms.12345.
- MORISAKA, T. 2012. Evolution of communication sounds in odontocetes: a review. **International Journal of Comparative Psychology**, 25: 1-20.
- MORON, J.R.; AMORIM, T.O.S.; SUCUNZA, F.; CASTRO, F.R.; ROSSI-SANTOS, M. & ANDRIOLO, A. 2015. Spinner dolphin whistle in the South

- West Atlantic Ocean: Is there a geographic variation? **J. Acoust. Soc. Am.** 138 (4): 2495–2498.
- MORRISSEY, R.P.; WARD, L.; DIMARZIO, N.; JARVIS, S. & MORETTI, D.J. 2006. Passive acoustic detection and localization of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in the Tongue of the Ocean. **Applied Acoustics**, 67:1091-1105.
- MOTTA, M.R.A. & SILVA, C.P.N. 2005. Rescue, handling and release of a melon-headed whale, *Peponocephala electra*, stranded in Ceará, NE Brazil. **Lajam** 4(2): 187-190.
- MOURA, J.F.; ACEVEDO-TREJOS, E.; TAVARES, D.C.; MEIRELLES, A.C.O.; SILVA, C.P.N; OLIVEIRA, L.R. et al. 2016. Stranding events of *Kogia* whales along the Brazilian Coast. **PLoS One**, 11(1): e0146108.
- MULLIN, K.D.; HIGGINS, L.V.; JEFFERSON, T.A. & HANSEN, L.J. 1994. Sightings of the Clymene dolphin (*Stenella clymene*) in the Gulf of Mexico. **Marine Mammal Science**, 10(4): 464-470.
- NEWMAN, K. & SPRINGER, A.M. 2008. Nocturnal activity by mammal-eating killer whales at a predation hot spot in the Bering Sea. **Marine Mammal Science** 24(4): 990-999.
- NOREN, D.P. & MOCKLIN, J.A. 2012. Review of cetacean biopsy techniques: factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. **Marine Mammal Science**, 28(1): 154-199.
- NORRIS, K.S. & HARVEY, G.W. 1972. A theory for the function of the spermaceti organ of the sperm whale *Physeter catodon* L. in **Animal Orientation and Navigation**. (eds Galler, S.R., Schmidt-Koenig, K., Jacobs, G.J. & Belleville, R.E.) pp. 397–417. SP-262 NASA, Washington, DC.
- NORRIS, T.F; MC DONALD, M. & BARLOW, J. 1999. Acoustic detections of singing humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the eastern North Pacific during their northbound migration. **Journal of Acoustical Society of America**, 106(1): 506–514.
- NOWACEK, D.P.; JOHNSON, M.P.; TYACK, P.L.; SHORTER, K.A.; MCLELLAN, W.A. & PABST, A. 2001. Buoyant balaenids: the ups and downs of buoyancy in right whales. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological**

- Sciences**, 268(1478): 1811-1816.
- OLIVEIRA, C.; WAHLBERG, M.; JOHNSON, M.; MILLER, P.J.O. & MADSEN, P.T. 2013. The function of male sperm whale slow clicks in a high latitude habitat: Communication, echolocation, or prey debilitation? *Journal of the Acoustical Society of America*, 133(5), 3135–3144.
- OLSEN, E.; BUDGELL, P.; HEAD, E.; KLEIVANE, L.; NOTTESTAD, L.; PRIETO, R.; SILVA, M.A.; SKOV, H.; VIKINGSSON, G.A; WARING, G. & OIEN, N. 2009. First satellite-tracked long-distance movement of a sei whale (*Balaenoptera borealis*) in the North Atlantic. **Aquatic Mammals** 35(3): 313-318.
- OREMUS, M.; POOLE, M.M.; STEEL, D. & BAKER, C.S. 2007. Isolation and interchange among insular spinner dolphin communities in the South Pacific revealed by individual identification and genetic diversity. **Marine Ecology Progress Series**, 336: 275-289.
- OSWALD, J.; RANKIN, S.; BARLOW, J. & LAMMERS, M.O. 2007. A tool for real-time acoustic species identification of delphinid whistles, **Journal of the Acoustic Society of America**, 122(1): 587-595.
- OSWALD, J.N. & OSWALD, M. 2013. ROCCA (Real-time Odontocete Call Classification Algorithm) **User's Manual**. Prepared for Naval Facilities Engineering Command Atlantic, Norfolk, Virginia under HDR Environmental, Operations and Construction, Inc., Contract No. CON005-4394-009, Subproject 164744, TaskOrder 03, Agreement # 105067. Prepared by Bio-Waves, Inc., Encinitas, California.
- OSWALD, J.N.; BARLOW, J. & NORRIS, T.F. 2003. Acoustic identification of nine delphinid species in the eastern tropical Pacific Ocean. **Marine Mammal Science**, 19(1): 20-37.
- OSWALD, J.N.; BARLOW, J. & NORRIS, T.F. 2003. Acoustic identification of nine delphinid species in the Eastern Tropical Pacific Ocean. **Marine Mammals Science**, 19(1): 20-37.
- OSWALD, J.N.; RANKIN, S. & BARLOW, J. 2004. The effect of recording and analysis bandwidth on acoustic identification of delphinid species. **Journal of the Acoustical Society of America**, 116, 3178-3185.

- OSWALD, J.N.; RANKIN, S. & BARLOW, J. 2008. To Whistle or Not to Whistle? Geographic Variation in the Whistling Behavior of Small Odontocetes. **Aquatic Mammals**, 34(3): 288-302.
- OSWALD, J.N.; WALKER, R.; HOM-WEAVER, C. & NORRIS, T.F. 2016. Manual and automated Atlantic whistle classifiers: improvement, testing and application. **Final Report Submitted to HDR Environmental, Operations and Construction, Inc.**, Norfolk, Virginia, under Contract No. N62470-10-D-3011 CTO 021. Prepared by Bio-Waves, Inc., Encinitas, California, 46p.
- OTTO, D. & MOON, T. 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. **Arch. Environ. Con. Tox.** 31, 141–147.
- OWEN, K.; DUNLOP, R.A.; MONTY, J.P.; CHUNG, D.; NOAD, M.J.; DONNELLY, D. et al. 2016. Detecting surface feeding behavior byrorqual whales in accelerometer data. **Marine Mammal Science**, 32(1), 327-348.
- PACK, A.A.; HERMAN, L.M.; CRAIG, A.S.; SPITZ, S.S.; WATERMAN, J.O.; HERMAN, E.Y.K. et al. 2017. Habitat preferences by individual humpback whale mothers in the Hawaiian breeding grounds vary with the age and size of their calves. **Animal Behaviour**, 133, 131–144.
- PAIVA, M.P. & MOTTA, P.C.S.D. 2000. Schools of Brazilian-sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner), in coastal waters of Rio de Janeiro State (Brazil). **Revista Brasileira de Zoologia**, 17(2), 339-346.
- PAPALE, E.; AZZOLIN, M.; CASCÃO, I.; GANNIER, A.; LAMMERS, M.O.; MARTIN, V.M.; OSWALD, J.; PEREZ-GIL, M., PRIETO, R.; SILVA, M.A. & GIACOMA, C. 2013. Geographic variability in the acoustic parameters of striped dolphin's (*Stenella coeruleoalba*) whistles. **Journal of the Acoustic Society of America** 133(2):1126–1134.
- PAPALE, E.; GAMBA, M.; PEREZ-GIL, M.; MARTIN, V.M. & GIACOMA, C. 2015. Dolphins Adjust Species Specific Frequency Parameters to Compensate for Increasing Background Noise. **PLoS One** 10(4): e0121711.
- PAPASTAVROU, V., SMITH, S.C. & WHITEHEAD, H. 1989. Diving behaviour of the sperm whale, *Physeter macrocephalus*, off the Galapagos Islands. **Canadian Journal of Zoology**, 67: 839-846.

- PASTENE, L.; ACEVEDO, J.; SICILIANO, S.; SHOLL, T.G.C.; DE MOURA, J.F.; OTT, P.H. & AGUAYO-LOBO, A. 2015. Population genetic structure of the South American Bryde's whale. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, 50:453-464.
- PAVANATO, H.; WEDEKIN, L.L.; GUILHERME-SILVEIRA, F.R.; ENGEL, M.H. & KINAS, P.G. 2017. Estimating humpback whale abundance using hierarchical distance sampling. **Ecological Modelling**, 358: 10-18.
- PAYNE, R. & MCVAY, S. 1971. Songs of humpback whales. **Science**, 173(3997): 585-597.
- PAYNE, R. 1976. At home with right whales. **National Geographic**, 149(3), 322-339.
- PAYNE, R. 1986. Long term behavioral studies of the southern right whale. **Reports of the International Whaling Commission** (Issue 10).
- PERRIN, W.F. & WURSIG, B. 2009. Encyclopedia of marine mammals. [S. l.]: **Academic Press**. San Diego, CA.
- PETROBRAS. 2015. Projeto Executivo. **Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS)**. Elaborado pela SOCIOAMBIENTAL Consultores Associados para a PETROBRAS. Florianópolis-SC.
- PETROBRAS. 2017. 2º Relatório Anual – Ciclos 1 a 4. **Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS)**. Relatório técnico elaborado pela SOCIOAMBIENTAL Consultores Associados para a PETROBRAS. Florianópolis-SC.
- PHILIPS, J. D.; NACHTIGALL, P. E.; AU, W. W.; PAWLOSKI, J. L. & ROITBLAT, H.L. 2003. Echolocation in the Risso's dolphin, *Grampus griseus*. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 113(1): 605-616.
- PINEDO, M.C. 1985. A note on a stranding of the humpback whale on the southern coast of Brazil. **Scientific Reports of the Whales Research Institute**, 36: 165-168.
- PINET, P.R. 2009a. Biological Productivity in the Ocean. In: Invitation to oceanography — 5th Ed. Edited by PINET, P.R. Sudbury, Massachusetts. **Jones and Bartlett Publishers**. pp.349-369. ISBN 978-0-7637-5993-3;
- PINET, P.R. 2009b. Marine Ecology. In: Invitation to oceanography — 5th Ed.

- Edited by PINET, P.R. Sudbury, Massachusetts. **Jones and Bartlett Publishers**. pp.339-349. ISBN 978-0-7637-5993-3;
- PINET, P.R. 2009c. Global Climate Change and the Oceans. In: Invitation to oceanography — 5th Ed. Edited by PINET, P.R. Sudbury, Massachusetts. **Jones and Bartlett Publishers**. pp.549-580. ISBN 978-0-7637-5993-3;
- PINET, P.R. 2009d. Biological Productivity in the Ocean. In: Invitation to oceanography — 5th Ed. Edited by PINET, P.R. Sudbury, Massachusetts. **Jones and Bartlett Publishers**. pp.369-376. ISBN 978-0-7637-5993-3;
- PRIETO, R.; SILVA, M.A. & WARING, G.T. 2014. Sei whale movements and behaviour in the North Atlantic inferred from satellite telemetry. **Endangered Species Research**, 26: 103-113.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, X. & FALUSH, D. 2007. Documentation for structure software: version 2.2. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>. **Progress Series**, 313: 295–304.
- QUANG, P. & BECKER, E. 1996. Line Transect Sampling Under Varying Conditions with Application to Aerial Surveys. **Ecological Society of America** 77(4):1297-1302.
- QUÉROUIL, S., SILVA, M. A., FREITAS, L., PRIETO, R., MAGALHÃES, S., DINIS, A., ALVES, F., MATOS, J.A., MENDONÇA, D., HAMMOND P.S. & SANTOS, R.S. 2007. High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. **Conservation Genetics**, 8(6): 1405-1419.
- QUÉROUIL, S.; FREITAS, L.; CASCAÃO, I.; ALVES, F.; DINIS, A.; ALMEIDA, J.R.; PIETRO R.; BORRAS, S.; MATOS, J.A.; MENDONÇA, D. & SANTOS, R.S. 2010. Molecular insight into the population structure of common and spotted dolphins inhabiting the pelagic waters of the Northeast Atlantic. **Marine biology**, 157(11): 2567-2580.
- RANKIN, S. & BARLOW, J. 2007a. Sounds recorded in the presence of Blainville's beaked whales, *Mesoplodon densirostris*, near Hawaii. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 122(1): 42-45.
- RANKIN, S., BARLOW, J. & OSWALD, J. 2008. An assessment of the accuracy and precision of localization of a stationary sound source using a two-element towed hydrophone array. U.S. Department of Commerce, **NOAA Technical**

Memorandum NOAA-TM-NMFSSWFSC - 416. 29 pp.

- READ, A.J. 1990. Reproductive seasonality in Harbor Porpoise, *Phocoena phocoena*, from the Bay of Fundy, **Canadian Journal Zoology** 68:284-288;
- REISINGER, R.R.; KEITH, M.; ANDREWS, R.D. & BRUYN, P.J.N. 2015. Movement and diving of killer whales (*Orcinus orca*) at a Southern Ocean archipelago. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 472: 90-102.
- RENDELL, L. & WHITEHEAD, H. 2003. Comparing repertoires of sperm whale codas: a multiple methods approach. **Bioacoustics**, 14(1), 61–81. <http://doi.org/10.1080/09524622.2003.9753513>
- RENDELL, L. & WHITEHEAD, H. 2004. Do sperm whales share coda vocalizations? Insights into coda usage from acoustic size measurement. **Animal Behaviour**, 67(5), 865–874.
- RENDELL, L. & WHITEHEAD, H. 2005. Spatial and temporal variation in sperm whale coda vocalizations: stable usage and local dialects. **Animal Behaviour**, 70(1): 191-198.
- RENDELL, L.; MATTHEWS, J.N.; GILL, A.; GORDON, J.C.D. & MACDONALD. 1999. Quantitative analysis of tonal calls from five odontocete species, examining interspecific and intraspecific variation. **Journal of Zoology** 249: 403–410.
- RENDELL, L.E. & WHITEHEAD, H. 2003. Vocal clans in sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 270(1512): 225-231.
- RICE, A.N.; PALMER, K. J.; TIELENS, J.T.; MUIRHEAD, C.A. & CLARK, C.W. 2014. Potential Bryde's whale (*Balaenoptera edeni*) calls recorded in the northern Gulf of Mexico. **Journal of Acoustical Society of America**, 135(5): 3066–3076.
- RICHARDSON, W.J.; GREEN, C.R.; MALME, C.I. & THOMSON, D.H. 1995. **Marine mammals and noise**. Academic Press, San Diego, CA.
- ROBBINS, J.; ZERBINI, A. N.; GALES, N.; GULLAND, F. M. D.; DOUBLE, M., CLAPHAM, P. J.; ANDREWS-GOFF, V.; KENNEDY, A. S.; LANDRY, S.; MATTILA, D. K. & TACKABERRY, J. 2013. Satellite tag effectiveness and

- impacts on large whales: preliminary results of a case study with Gulf of Maine humpback whales. SC/65a/SH05.
- ROCH, M.A.; BRANDES, T.S.; PATEL, B.; BARKLEY, Y.; BAUMANN-PICKERING, S. & SOLDEVILLA, M.S. 2011. Automated extraction of odontocete whistle contours. **Journal of Acoustical Society of America**, 130(4): 2212–2223.
- ROCHA, J. M. & BRAGA, N.M.A. 1982. Progress report on cetacean research: June 1980 to May 1981. **Reports of the International Whaling Commission** 32: 155-159.
- ROCHA, J.M. 1984. Progress report on cetacean research, June 1982 to May 1983. **Reports of the International Whaling Commission**, Cambridge 34: 1-189.
- ROGERS, T.L. & BROWN, S.M. 1999. Acoustic observations of Arnoux's beaked whale (*Berardius arnuxii*) off Kemp Land, Antarctica. **Marine Mammal Science**, 15(1): 192-198.
- ROSAS, F.C.W. & MONTEIRO-FILHO, E.L.A. 2002. Reproduction of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) on the coast of Paraná, southern Brazil. **Journal of Mammology**. 83(2):507-515;
- ROSS, H.A.; LENTO, G.M.; DALEBOUT, M.L.; GOODE, M.; EWING, G.; MCLAREN, P.; RODRIGO, A.G.; LAVERY, S. & BAKER, C.S. 2003. DNA Surveillance: Web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. **Journal of Heredity**, 94:111–114.
- ROSSI-SANTOS, M.R.; WEDEKIN, L.L. & SOUSA-LIMA, R.S. 2006. Distribution and habitat use of small cetaceans in the Abrolhos Bank, Eastern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 5(1): 23-28.
- RYAN, C.; BERROW, S.D.; MCHUGH, B.; O'DONNELL, C.; TRUEMAN, C.N. & O'CONNOR, I. 2014. Prey preferences of sympatric fin (*Balaenoptera physalus*) and humpback (*Megaptera novaeangliae*) whales revealed by stable isotope mixing models. **Marine Mammal Science**, 30(1), 242-258.
- SAHA, S.; MOORTHY, S.; PAN, H.L.; WU, X.; WANG, J. et al. 2010. The NCEP Climate Forecast System Reanalysis. **Bulletin of the American Meteorological Society**, 91(8): 1015-1057.

- SAKAI, M.; KARCZMARSKI, L.; MORISAKA, T. & THORNTON, M. 2010. Reactions of Heaviside's dolphins to tagging attempts using remotely-deployed suction-cup tags. **South African Journal of Wildlife Research** 41 (1): 134-138.
- SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; BUENO-CRESPO, A., & SANCHO-GÓMEZ, J.L. 2010. An efficient statistics-based method for the automated detection of sperm whale clicks. **Applied Acoustics**, 71(5), 451–459.
- SANTOS, M.C.D.O. 2016. A rare sighting of a bottlenose whale (*Hyperoodon planifrons*, Flower, 1882) in shallow waters off southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 64(1): 105-110.
- SANTOS, M.C.O. & NETTO, D.F. 2005. Killer whale (*Orcinus orca*) predation on franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in Brazilian waters. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 4(1): 69-72.
- SANTOS, M.C.O. & SILVA, E. 2009. Records of a male killer whale (*Orcinus orca*) off southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 57: 65-68.
- SANTOS, M.C.O.; AÇUÑA, L.B. & ROSSO, S. 2001. Insights on site fidelity and calving intervals of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in southeastern Brazil, **Journal Marine Biology Association** 81:1049-1052.
- SANTOS, M.C.O.; ZAMPIROLI, E.; DE CASTRO, A.F.V. & ALVARENGA, F.S. 2003. A Gervais' beaked whale (*Mesoplodon europaeus*) washed ashore in southeastern Brazil: extra limital record? **Aquatic Mammals**, 29: 404-410.
- SCHILLING, M.R.; SEIPT, I.; WEINRICH, M.T.; FROHOCK, S.E.; KUHMBERG, A.E. & CLAPHAM, P.J. 1992. Behavior of individually identified Sei whales, *Balaenoptera borealis*, during an episodic influx into the southern Gulf of Maine in 1986. **Fishery Bulletin**, 90(4): 749-755.
- SCHNEIDER, K.; BAIRD, R.W.; DAWSON, S.; VISSER, I. & CHILDERHOUSE, S. 1998. Reactions of bottlenose dolphins to tagging attempts using a remotely-deployed suction-cup tag. **Marine Mammal Science** 14(2): 316-324.
- SCHWACKE, L.; SMITH, C.; TOWNSEND, F.; WELLS, R.; HART, L.; BALMER, B.; COLLIER, K.; GUISE, S.; FRY, M.; GUILLETTE, L.; LAMB, S.; LANE, S.; MCFEE, W.; PLACE, N.; TUMLIN, M.; YLITALO, G.; ZOLMAN, E. & ROWLES, T. 2014. Health of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops*

- truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, Following the Deepwater Horizon oil spill. **Environ. Sci. Technol.** 48, 93–103.
- SCOTT M.D.; HOHN, A.A.; WESTGATE, A.J.; NICOLAS, J.R.; WHITAKER, B.R. & CAMPBELL, W.B. 2001. A note on the release and tracking of a rehabilitated pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). **Journal of Cetacean Research and Management**, 3: 87–94.
- SECCHI, E.R. & VASKE JR., T. 1998. Killer whale (*Orcinus orca*) sightings and depredation on tuna and swordfish longline catches in southern Brazil. **Aquatic Mammals**, 24 (2): 117-122.
- SECCHI, E.R. & ZARZUR, S. 1999. Plastic debris ingested by a Blainville's beaked whale, *Mesoplodon densirostris*, washed ashore in Brazil. **Aquatic Mammals**, 25(1): 21-24.
- SHANE, S.H.; WELLS, R.S. & WURSIG, B. 1986. Ecology, behavior and social organisation of the bottlenose dolphin: A review. **Marine Mammal Science** 2:24–63.
- SHIRIHAI, H. & JARRET, B. 2006. **Whales, dolphins and other marine mammals of the world. Princeton Field Guides.** Princeton University Press, Princeton and Oxford.
- SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A.P.M. & RAMOS, R.M.A. 2002. A Toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia.** v. 476, p. 1-15.
- SICILIANO, S.; EMIN-LIMA, N.R.; COSTA, A.F.C.; RODRIGUES, A.L.F.; MAGALHÃES, F.A.; TOSI, C.H.; GARRI, R.G.; SILVA, C.G. & SILVA JR., J.S. 2008: **Revisão do conhecimento sobre os mamíferos aquáticos da costa norte do Brasil.** Arquivos do Museu Nacional, 66, 381-401.
- SICILIANO, S.; LAILSON-BRITO, J. & AZEVEDO, A. 1999. Seasonal occurrence of killer whales (*Orcinus orca*) of Rio de Janeiro, Brazil. **Zeitschrift fur Saugetierkunde** 64(4): 251-255.
- SICILIANO, S.; SANTOS, M.C.O.; VICENTE, A.F.C.; ALVARENGA, F.S. 2004. Strandings and feeding records of Bryde's whales (*Balaenoptera edeni*) in

- Southeastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 84(4): 857-859.
- SILVA, I.F.; KAUFMAN, G.D.; HUTSEL, A.; MACIE, A.; MALDINI, D. & RANKIN, R. 2012. **Mid migration humpback whale feeding behavior off Eden, NSW, Australia.** SC/63/SH12.
- SIMILÄ, T.; HOLST, J.C. & CHRISTENSEN, I. 1996. Occurrence and diet of Killer Whale in northern Norway: Seasonal patterns relative to the distribution and abundance of Norwegian Spring-Spawning Herring. **Canadian Journal Fish Aquatic Science** 53:769-779;
- SIMÕES-LOPES, P.C. & FABIAN, M.E. 1999. Residence patterns and site fidelity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Montagu) (Cetacea, Delphinidae) off Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16(4): 1017-1024.
- SKOV, H.; GUNNLAUGSSON, T.; BUDGELL, W.P.; HORNE, J.; NØTTESTAD, L.; OLSEN, E. et al. 2008. Small-scale spatial variability of sperm and Sei whales in relation to oceanographic and topographic features along the Mid-Atlantic Ridge. **Deep-Sea Research II**, 55: 254-268.
- SMOLKER, R.A.; MANN, J. & SMUTS, B. B. 1993. Use of signature whistles during separations and reunions by wild bottlenose dolphin mothers and infant. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 33, 393-402.
- SOLDEVILLA, M.S.; BAUMANN-PICKERING, S.; CHOLEWIAK, D.; HODGE, L.E.; OLESON, E.M. & RANKIN, S. 2017. Geographic variation in Risso's dolphin echolocation click spectra. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 142(2): 599-617.
- SOLDEVILLA, M.S.; FRASIER, K. & DIAS, A.A. 2017. Spatial distribution and dive behavior of Gulf of Mexico Brydes's whales: potential risk of vessel strikes and fisheries interactions. **Endangered Species Research** 32:533-550.
- SOLDEVILLA, M.S.; HENDERSON, E.E.; CAMPBELL, G.S.; WIGGINS, S.M.; HILDEBRAND, J.A. & ROCH, M.A. 2008. Classification of Risso's and Pacific white-sided dolphins using spectral properties of echolocation clicks. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 124(1): 609-624.
- SOUTO, L.R.A.; OLIVEIRA, J.G.A.; DA COSTA, J.D.A.C.; MAIA-NOGUEIRA, R. & SAMPAIO, C.L. 2007. Análise das mordidas de tubarões-charuto, *Isistius* spp.

- (Squaliformes: Dalatiidae) em cetáceos (Mammalia: Cetacea) no litoral da Bahia, Nordeste do Brasil. **Biotemas**, 20(1), 19-25.
- SOUZA, S.P.; SICILIANO, S.; CUENCA, S. & SANCTIS, B. 2005. A True's beaked whale (*Mesoplodon mirus*) on the coast of Brazil: adding a new beaked whale species to the Western Tropical Atlantic and South America. **Latin American Journal of aquatic mammals**, 4(2): 129-136.
- SREMBA, A.L.; HANCOCK-HANSER, B.; BRANCH, T.A.; LEDUC, R.L. & BAKER, C.S. 2012. Circumpolar diversity and geographic differentiation of mtDNA in the critically endangered Antarctic blue whale (*Balaenoptera musculus intermedia*). **PLoS One**, 7(3), e32579.
- STANLEY, R. 1995. DARWIN: identifying dolphins from dorsal fin images. **Senior Thesis, Eckerd College**.
- STEINER, W.W. 1981. Species-specific differences in pure tonal whistle vocalizations of five western north Atlantic dolphin species. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 9:241–246.
- STIMPERT, A.K.; DERUITER, S.L.; FALCONE, E.A.; JOSEPH, J.; DOUGLAS, A.B.; MORETTI, D.J., et al. 2015. Sound production and associated behavior of tagged fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Southern California Bight. **Animal Biotelemetry**, 3(1): 23.
- STIMPERT, A.K.; WILEY, D.N.; AU, W.W.L.; JOHNSON, M.P. & ARSENAULT, R. 2007. “Megapclicks”: acoustic click trains and buzzes produced during night-time foraging of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Biology Letters**, 3(5), 467-470.
- TANABE, S. 2002. Contamination and Toxic Effects of Persistent Endocrine Disrupters in Marine Mammals and Birds. **Mar. Poll. Bull.** 45, 69-77.
- TELLECHIA, J.S. & NORBIS, W. 2012. A note on recordings of Southern right whales (*Eubalaena australis*) off the coast of Uruguay. **Journal of Cetacean Research and Management**, 12(3): 361-364.
- TELONI, V. 2005. Patterns of sound production in diving sperm whales in the northwestern Mediterranean. **Marine Mammal Science**, 21(3): 446-457.
- TERSHEY, B.R.; ACEVEDO-GUTIÉRREZ, A.; BREESE, D. & STRONG, C. 1993. Diet and feeding behavior of fin and Bryde's whales in the central Gulf of

- California, Mexico. **Rev Inv Cient**, 1, 31-38.
- TEZANOS-PINTO, G. & BAKER, C.S. 2012. Short-term reactions and long-term responses of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) to remote biopsy sampling. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 46(1): 13-29.
- THAYER, V.G.; READ, A.J.; COLBY, D.R.; HORN, A.A.; MCLELLAN, W.A.; PABST, D.A.; DEAROLF, J.L.; BOWLES, N.I.; RUSSEL, J.R. & RITTMASER, K.A. 2003. Reproductive seasonality of western Atlantic bottlenose dolphins of North Carolina, USA. **Marine Mammal Science** 19(4): 617-629.
- THERNEAU. T. & ATKINSON, B. 2018. **rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees**. R package version 4.1-13. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=rpart>>. Acesso em: 30 setembro de 2018.
- THOMAS, L. & MARQUES, T.A. 2012. Passive acoustic monitoring for estimating animal density. **Acoustics Today**, 8(3): 35-44.
- THOMAS, L.; BUCKLAND, S.T.; REXSTAD, E.A.; LAAKE, J.L.; STRINDBERG, S.; HEDLEY, S.L.; BISHOP, J.R.B.; MARQUES, T.A. & BURNHAM, K.P. 2010. Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. **Journal of Applied Ecology**, 47: 5-14.
- TORRES-FLOREZ, J.P.; HUCKE-GAETE, R.; ROSENBAUM, H. & FIGUEROA, C.C. 2014. High genetic diversity in a small population: the case of Chilean blue whales. **Ecology and Evolution**, 4(8):1398-1412.
- TOWERS, J. R.; TIXIER, P.; ROSS, K. A.; BENNETT, J.; ARNOULD, J.P.Y.; PITMAN, R.L. & DURBAN, J.W. 2018. Movement and dive behavior of a toothfish-depredating killer and sperm whale. **ICES Journal of Marine Science**, DOI: 10.1093/icesjms/fsy118.
- TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. 2011a. Biological Productivity and Energy Transfer. In: Essentials of oceanography. 10th Ed. Edited by TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. **Glenview**. Pearson Education Inc. pp.371-401. ISBN-13: 978-0-321-66812-7.
- TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. 2011b. The Oceans and Climate Change. In:

- Essentials of oceanography. 10th Ed. Edited by TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. **Glenview**. Pearson Education Inc. pp.469-494. ISBN-13: 978-0-321-66812-7.
- TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. 2011c. Ocean Circulation. In: Essentials of oceanography. 10th Ed. Edited by TRUJILLO, A.P. & THURMAN, H.V. **Glenview**. Pearson Education Inc. pp.216- 222. ISBN-13: 978-0-321-66812-7.
- TYACK, P. & CLARK, C.W. 2000. Communication and acoustic behavior of dolphins and whales. In: AU, W. W. L., POPPER, A. N.; FAY, R. R. (Eds.), **Hearing by whales and dolphins** (pp. 156-224). New York: Springer- Verlag.
- TYACK, P. 2006. Extreme diving of beaked whales. **Journal of Experimental Biology**, 209: 4238-4253.
- TYSON, R.B.; FRIEDLAENDER, A.S. & WARE, C. 2012. Synchronous mother and calf foraging behaviour in humpback whales *Megaptera novaeangliae*: insights from multi-sensor suction cup tags. **Marine Ecology Progress Series**, 457: 209-220.
- URIAN, K.W.; DUFFIELD, D.A.; READ, A.J.; WELL, R.S. & SHELL, E.D. 1996. Seasonality of reproduction in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Journal of Mammalogy**. 77(2):394-403.
- VALENTIN, J.L. 2000. **Ecologia Numérica**. Rio de Janeiro: Interciência.
- VALSECCHI, E.; GLOCKNER-FERRARI, D.; FERRARI, M. & AMOS, W. 1998. Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. **Molecular Ecology**, 7(10): 1419-1422.
- VAN BRESSEM, M.F. et al. 2009. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Diseases of aquatic organisms**, 86(2), 143-157.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M & SHIPLEY, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4:535-538.
- VAN-DER-OOST. R.; BEYER, J. & VERMEULEN, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13, 57-149.
- VENABLES, W.N. & RIPLEY, B.D. 2002. **Modern Applied Statistics with S**.

- Fourth Edition. Springer, New York.
- VERMEULEN, E.; HOLSBEEK, L. & DAS, K. 2015. Diurnal and seasonal variation in the behavior of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Bahia San Antonio, Patagonia, Argentina. **Aquatic Mammals** 41(3): 272-283.
- VIRICEL, A. & ROSEL, P.E. 2014. Hierarchical population structure and habitat differences in a highly mobile marine species: the Atlantic spotted dolphin. **Molecular Ecology**, 23(20): 5018-5035.
- VISSER, I.N. 1999. Propeller scars and known migration of two killer whales (*Orcinus orca*) in New Zealand waters. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 33(4): 635-642.
- WAGENER A.; MENICONI M.; HAMACHER, C.; FARIAS, C.; DA SILVA, G.; GABARDO, I. & SCOFIELD, A. 2012. Hydrocarbons in sediments of a chronically contaminated bay: the challenge of source assignment. **Mar. Poll. Bull.** 64, 284–94.
- WAGENER, A.; HAMACHER, C.; FARIAS, C.; GODOY J. & SCOFIELD, A. 2010. Evaluation of tools to identify hydrocarbon sources in recent and historical sediments of a tropical bay. **Mar. Chem.** 121, 67–79.
- WAHLBERG, M.; BEEDHOLM, K.; HEERFORDT, A. & MØHL, B. 2011. Characteristics of biosonar signals from the northern bottlenose whale, *Hyperoodon ampullatus*. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 130(5): 3077-3084.
- WANG, Z.; FINGAS, M. & PAGE, D.S. 1999. Oil spill identification. **J. Chromatogr. A.** 843, 369-411.
- WANG, Z.; FINGAS, M.; LANDRIAULT, P.; SIGOUIN, L.; FENG, Y. & MULLIN, J. 1997. Using systematic and comparative analytical data to identify the source of an unknown oil on contaminated birds. **J. Chromatogr. A.** 775, 251-265.
- WARD, J.A.; THOMAS, L.; JARVIS, S.; DIMARZIO, N.; MORETTI, D.; MARQUES, T.A.; CHARLOTTE, D.; CLARIDGE, D. & HARTVIG, E. 2012. Passive acoustic density estimation of sperm whales in the Tongue of the Ocean, Bahamas. **Marine Mammal Science**, 28(4): E444-E455.
- WATKINS, W.A. & SCHEVILL, W.E. 1977. Sperm whale codas. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 62(6): 1485-1490.

- WATKINS, W.A. 1981. Reaction of three species of whales *Balaenoptera physalus*, *Megaptera novaeangliae*, and *Balaenoptera edeni* to implanted radio tags. **Deep Sea Res. Part A Oceanogr. Res. Pap.** 28: 589–599. doi:10.1016/0198-0149(81)90119-9.
- WATWOOD, S.; MILLER, P.O.; JOHNSON, M.; MADSEN, P.T. & TYACK, P.L. 2006. Deep-diving foraging behavior of sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Journal of Animal Ecology**, 75:814–825.
- WEBSTER, T.A.; DAWSON, S.M.; RAYMENT, W.J.; PARKS, S.E. & VAN PARIJS, S.M. 2016. Quantitative analysis of the acoustic repertoire of southern right whales in New Zealand. **The Journal of the Acoustical Society of America** 140(1):322-333.
- WEDEKIN, L.L. 2011. **Ecologia populacional da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae* BOROWSKI, 1871) em sua área reprodutiva na costa do Brasil, Oceano Atlântico Sul**. Tese de Doutorado da UFPR.
- WEDEKIN, L.L., DAURA-JORGE, F.G., ROSSI-SANTOS, M.R. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2008. Notes on the distribution, group size and behavior of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus* (Cetacea: Delphinidae) in the coast of the Island of Santa Catarina, southern Brazil. **Biota Neotropica**, 8(4).
- WEDEKIN, L.L., NEVES, M.C., MARCONDES, M.C.C., BARACHO, B., ROSSI-SANTOS, M.R., ENGEL, M.H. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2010. Site fidelity and movements of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Brazilian breeding ground, southwestern Atlantic. **Marine Mammal Science**, 26(4): 787–802 doi: 10.1111/j.1748-7692.2010.00387.x.
- WEDEKIN, L.L., ROSSI-SANTOS, M.R., BARACHO, C., CYPRIANO-SOUZA, A.L. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2014. Cetacean records along a coastal-offshore gradient in the Vitória-Trindade Chain, western South Atlantic Ocean. **Brazilian Journal of Biology**, 74(1): 137-144.
- WEILGART, L. & WHITEHEAD, H. 1988. Distinctive vocalizations from mature male sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Canadian Journal of Zoology**, 66(9): 1931-1937.
- WEILGART, L. & WHITEHEAD, H. 1993. Coda communication by sperm whales (*Physeter macrocephalus*) off the Galapagos Islands. **Canadian Journal of**

Zoology, 71(4): 744-752.

- WEILGART, L. & WHITEHEAD, H. 1997. Group-specific dialects and geographical variation in coda repertoire in South Pacific sperm whales. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 40(5): 277-28
- WEINRICH, M.T.; LAMBERTSEN, R.H.; BELT, C.R.; SCHILLING, M.R.; IKEN, H.J. & SYRJALA, S.E. 1992. Behavioral reactions of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, to biopsy procedures. **Fishery Bulletin**, 90: 588–598.
- WEIR, C.R.; POLLOCK, C.; CRONIN, C. & TAYLOR, S. 2001. Cetaceans of the Atlantic frontier, north and west of Scotland. **Continental Shelf Research**, 21, 1047-1071.
- WELLS, R.S. & SCOTT, M.D. 1999. Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, (Montagu, 1821). Pp. 137–182 in: **The handbook of marine mammals**. Vol. 6. The second book of the dolphins and the porpoises (S. H. Ridgway and S. R. Harrison, eds.). Academic Press, San Diego, California.
- WELLS, R.S.; BORDINO, P. & DOUGLAS, D.C. 2013. Patterns of social association in the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Marine Mammal Science**, 29(4).
- WELLS, R.S.; HANSEN, L.J.; BALDRIDGE, A B.; DOHL, T.P.; KELLY, D.L. & DEFRAN, R.H. 1990. Northward extension of the range of bottlenose dolphins along the California coast. In: Leatherwood and R. R. Reeves (eds.), **The Bottlenose Dolphin**. New York: Academic Press, pp 421-412.
- WELLS, R.S.; RHINEHART, H.L.; CUNNINGHAM, P.; WHALEY, J.; BARAN, M.; KOBERNA, C. & COSTA, D.P. 1999. Long distance offshore movements of bottlenose dolphins. **Mar. Mamm. Sci.** 15(4):1058-1114.
- WEST, K.L.; WALKER, W.A.; BAIRD, R.W.; WEBSTER, D.L.; SCHORR, G.S. 2018. Stomach contents and diel diving behavior of melon-headed whales (*Peponocephala electra*) in Hawaiian waters. **Marine Mammal Science**, DOI: 10.1111/mms.12507.
- WETZEL, D.; PULSTER, E.; REYNOLDS, J.; MORALES, B.; GELSLEICHTER, J. & OLIAEI, F. 2008. **Organic contaminants in West Indian manatees from Florida and Mexico: a pilot study**, Mote Marine Laboratory Technical

- Report. n. 1263, p. 1-33.
- WHITEHEAD, H. & WEILGART, L. 1991 Patterns of visually observable behaviour and vocalizations in groups of female sperm whales. **Behaviour**, 118: 275-296.
- WHITEHEAD, H. & WEILGART, L. 2000. The sperm whale: social females and roving males. In: **Cetacean Societies: field studies of dolphins and whales**. Mann, J., Connor, R. C., Tyack, P. L & Whitehead, H. (eds), Chicago: University of Chicago Press pp. 154-172.
- WHITEHEAD, H. 2002. Estimates of the current global population size and historical trajectory for sperm whales. **Marine Ecology Progress Series**, 242: 295-304.
- WHITEHEAD, H. 2003. **Sperm whales: social evolution in the ocean**. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- WHYTE, J.; JUNG, R.; SCHMITT, C.; TILLITT, D. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Crit. Rev. Toxicol.** 30, 347-570.
- WILBERG, M.J. & DREHER, B.P. 2004. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. **Molecular Ecology Notes**, 4 (4): 783-785.
- WILLIAMS, J. A., DAWSON S. M. & SLOOTEN. E. 1993. The abundance and distribution of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Doubtful Sound, New Zealand. **Canadian Journal of Zoology**, 71, 2080–2088.
- WILLIAMSON, G.R. 1975. **Minke whales off Brazil**. Scientific Reports Whales Research Institute. 27: 37-59.
- WILLIS, P.M. & BAIRD, R. W. 1998. Status of the dwarf sperm whale, *Kogia simus*, with special reference to Canada. **Canadian Field-Naturalist**, 112(1): 114-125.
- WILSON, B., THOMPSON, P.M., & HAMMOND, P.S. 1997. Habitat use by bottlenose dolphins: seasonal distribution and stratified movement patterns in Moray Firth, Scotland. **Journal of Applied Ecology**. 34(6):1365- 1374;
- WILSON, B.; ARNOLD, H.; BEARZI, G.; FORTUNA, C.M.; GASPAR, R.; INGRAM, S.; LIRET, C.; PRIBANIĆ, S.; READ, A.J.; RIDOUX, V.; SCHNEIDER, K.; URIAN, K.W.; WELLS, R. S.; WOOD, C.; THOMPSON, P.M.

- & HAMMOND, P. S. 1999. Epidermal diseases in bottlenose dolphins: impacts of natural and anthropogenic factors. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 266(1423), 1077-1083.
- WITTEVEEN, B.H., DE ROBERTIS, A., GUO, L. & WYNNE, K.M. 2014. Using dive behavior and active acoustics to assess prey use and partitioning by fin and humpback whales near Kodiak Island, Alaska. **Marine Mammal Science**, 31(1): 255-278.
- WITTEVEEN, B.H., WORTHY, G.A.J., WYNNE, K.M., HIRONS, A.C., ANDREWS, A.G. III AND MARKEL, R.W. 2011. Trophic levels of north pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) through analysis of stable isotopes: implications on prey and resource quality. **Aquatic Mammals** 37(2): 101-110
- WOODWORTH, P.A., SCHOORR, G.S., BAIRD, R.W., WEBSTER, D.L., MCSWEENEY, D.J., HANSON, M.B. & ANDREWS, R. 2011. Eddies as offshore foraging grounds for melon-headed whales (*Peponocephala electra*). **Marine Mammal Science** 28(3): 638-647.
- WORTON, B.J. 1989. Kernel methods for estimating the utilization distribution in home-range studies. **Ecology**, 70(1): 164-168.
- WRIGHT, B.M., FORD, J.K.B., ELLIS, G.M., DEECKE, V.B., SHAPIRO, A.D., BATTAILE, B.C. & TRITES, A.W. 2017. Fine-scale foraging movements by fish-eating killer whales (*Orcinus orca*) relate to the vertical distributions and escape responses of salmonid prey (*Oncorhynchus* spp.). **Movement Ecology**, 1: 1181.
- WRIGHT, B.M.; FORD, J.K.B.; ELLIS, G.M.; DEECKE, V.B.; SHAPIRO, A.D.; BATTAILE, B.C. & TRITES, A.W. 2017. Fine-scale foraging movements by fish-eating killer whales (*Orcinus orca*) relate to the vertical distributions and escape responses of salmonid prey (*Oncorhynchus* spp.). **Movement Ecology**, 5(3).
- WÜRSIG, B. & JEFFERSON, T.A. 1990. Methods of photo-identification for small cetaceans. **Reports of the International Whaling Commission** (Special Issue 12), 42-43.
- WÜRSIG, B. & WÜRSIG, M. 1977. The photographic determination of group size, composition, and stability of coastal porpoises (*Tursiops truncatus*). **Science**,

- 198(4318), 755-756.
- YORDY, J.; WELLS, R.; BALMER, B.; SCHWACKE, L.; ROWLES, T. & KUCKLICK, J. 2010. Life history as a source of variation for persistent organic pollutant (POP) patterns in a community of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to Sarasota Bay, FL. **Sci. Total Environ.** 408, 2163-2172.
- YUNKER, M.; MACDONALD, R.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, R.; GOYETTE, D. & SYLVERTRE, S. 2002. PAHs in the Fraser River Basin: a Critical Appraisal of PAH Ratios as Indicators of PAH Source and Composition. **Org. Geochem.** 33, 489-515.
- ZERBINI, A.N., ANDRIOLO, A., HEIDE-JORGENSEN, M.P., PIZZORNO, J.L., MAIA, Y.G., VANBLARICOM, G.R., DEMASTER, D.P., SIMÕES-LOPES, P.C., MOREIRA, S., BETHLEM, C. 2006. Satellite-monitored movements of humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, 313: 295–304
- ZERBINI, A.N.; ANDRIOLO, A.; ROCHA, J.M.; SIMÕES-LOPES, P.C. et al. 2004. Winter distribution and abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Northeastern Brazil. **Journal of Cetacean Research and Management**, 6(1): 101-107.
- ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; SICILIANO, S. & SIMÕES-LOPES, P.C. 1997. A review of the occurrence and distribution of whales of the Genus *Balaenoptera* along the Brazilian Coast. **Report of the International Whaling Commission**, 47: 407-417.
- ZIMMER, W.M., HARWOOD, J., TYACK, P.L., JOHNSON, M.P. & MADSEN, P.T. 2008. Passive acoustic detection of deep-diving beaked whales. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 124, 2823.
- ZIMMER, W.M., JOHNSON, M.P., MADSEN, P.T. & TYACK, P. L. 2005c. Echolocation clicks of free-ranging Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*). **The Journal of the Acoustical Society of America**, 117(6): 3919-3927.
- ZIMMER, W.M., MADSEN, P.T., TELONI, V., JOHNSON, M.P., & TYACK, P.L. 2005b. Off-axis effects on the multipulse structure of sperm whale usual clicks

with implications for sound production. **The Journal of the Acoustical Society of America**: 118(5): 3337-3345.

ZIMMER, W.M., TYACK, P.L., JOHNSON, M.P., & MADSEN, P.T. 2005a. Three-dimensional beam pattern of regular sperm whale clicks confirms bent-horn hypothesis. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 117(3): 1473-1485.

ZUUR, A.F., IENO, E.N. & SMITH, G.M. 2007. **Analyzing ecological data**. Springer, New York.

VIII. ANEXOS

Anexo IV.1.2-1: Resultados da identificação genética das amostras por DNAm e sexagem molecular. * Espécies identificadas em campo que não foram corroboradas pelos resultados genéticos. N/A = not available. Identificação dos haplótipos: HT = *Tursiops truncatus*, HSO = *Sotalia guianensis*, HDD = *Delphinus delphis*, HSB = *Steno bredanensis*, HSF = *Stenella frontalis*, HSL = *S. longirostris*, HSA = *S. attenuata*, HSC = *S. clymene*, HGM = *Globicephala macrorhynchus*, HO = *Orcinus orca*, HPE = *Peponocephala electra*, HPM = *Physeter macrocephalus*, HBE = *Balaenoptera brydei*, HBB = *B. bonaerensis*, HBM = *B. musculus*, HBP = *B. physalus*, HBb = *B. borealis*, HBA e HGA = *M. novaeangliae*, HEA = *Eubalaena australis*.

Amostras	Haplótipo	Identificação genética DNA Surveillance	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G1	HT1	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G2	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G3	HSO1	<i>Sotalia guianensis</i>	<i>S. guianensis</i>	<i>S. guianensis</i>	Macho
G4	HSO1	<i>Sotalia guianensis</i>	<i>S. guianensis</i>	<i>S. guianensis</i>	Fêmea
G5	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G6	HT1	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G7	HT4	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G8	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G9	HSF1	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G10*	HDD1	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. capensis</i>	Fêmea
G11*	HDD1	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. capensis</i>	Fêmea
G12	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G13	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G14	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G15	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G16	HSB1	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Macho
G17	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G18	HT6	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G19	HSB1	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Fêmea
G20	HSL1	<i>Stenella longirostris</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G21*	HSA1	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G22	HSL2	<i>Stenella longirostris</i>	<i>T. australis</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G23	HSA2	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G24	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni</i>	Fêmea
G25	HSL3	<i>Stenella longirostris</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G26	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G27	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G28	HSL4	<i>Stenella longirostris</i>	<i>T. australis</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G29	HSL5	<i>Stenella longirostris</i>	<i>T. australis</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G30	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni</i>	Macho
G31	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G32	HT7	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G33	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G34	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G35*	HSF1	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. attenuata</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G36	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G37	HT8	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G38	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G39	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G40	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G41	HSL3	<i>Stenella longirostris</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G42	HBB1	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	Macho
G43	HSF4	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G44	HSC1	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Fêmea
G45	HBP1	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Macho
G46	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G47	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G48	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G49	HSF5	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G50	HSF6	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G51	HBA074	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G52	HGA025	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G53	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G54	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G55	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G56	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G57	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G58	HT9	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G59	HDD2	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>Delphinus sp.</i>	Macho
G60	HDD3	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>Delphinus sp.</i>	Fêmea
G61	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G62	HGA004	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G63	HBb1	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G64	HSL6	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G65	HSL7	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G66	HBb2	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G67*	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. borealis</i>	N/A
G68*	HBE2	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea
G69	HBP2	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Fêmea
G70	HBb2	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea
G71	HBb3	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G72	HBb4	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G73	HBb5	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G74	HBb6	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G75	HBb7	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G76	HBb8	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G77	HBb9	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea
G78	HGA011	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G79	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G80	HGM1	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	<i>G. macrorhynchus</i>	<i>Globicephala sp.</i>	Macho
G81	HDD4	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. delphis</i>	Macho
G82	HSF9	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G83	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G84	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G85	HSL2	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G86	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Fêmea
G87	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G88	HSL4	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G89	HSL8	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G90	HSF9	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G91	HSF5	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G92	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G93	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Macho
G94	HSL9	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G95	HSL10	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G96	HSL2	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G97	HSL11	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G98	HSL12	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G99	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G100	HT10	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G101	HSL2	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G102	HSL3	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G103	HSL13	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G104	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Fêmea
G106	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Fêmea
G107	HBE3	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Fêmea
G108	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G109	HT11	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G110	HSB1	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Macho
G111	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G112	HBE1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. edeni brydei</i>	Macho
G113	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G114	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
GM1	HGA002	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
GM2	HGA002	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
GM3	HGA036	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G115	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G116	HSB2	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Fêmea
G117	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G118	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G119	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G120	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G121	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G122	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G123	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G124	HSF10	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G125	HT3	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G126	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G127	HT11	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G128	HT13	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G129	HBP3	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Macho
G130	HBP3	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Macho
G131	HSC2	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Fêmea
G132	HSC3	<i>Stenella clymene</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. clymene</i>	Macho
G133	HSC4	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G134	HSC5	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Macho
G135	HBA004	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G136	N/A	N/A	N/A	<i>M. novaeangliae</i>	N/A
G137*	HBB2	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	<i>B. edeni</i>	Fêmea
G138*	HBB3	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	<i>B. edeni</i>	Macho
G139	HBM1	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	Fêmea
G140	HBb10	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea
G141	HBP4	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Macho
G142	HBA012	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G143	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G144	HBA010	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G145	N/A	N/A	N/A	<i>T. truncatus</i>	N/A
G146	HBA002	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G147	HBA002	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G148	HBb7	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Fêmea
G149	HBb2	<i>Balaenoptera borealis</i>	<i>B. borealis</i>	<i>B. borealis</i>	Macho
G150	HBA007	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G151	HBA049	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G152	HBB4	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	Macho
G153	HBB5	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	<i>B. bonaerensis</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G154	HSF11	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G155	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G156	HBA049	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G157	HBA049	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G158	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G159	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G160	HBM2	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	N/A
G161	HBM2	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	Macho
G162	HBM2	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	N/A
G163	HBM2	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	Macho
G164	HBM2	<i>Balaenoptera musculus</i>	<i>B. musculus</i>	<i>B. musculus</i>	N/A
G165	HO1	<i>Orcinus orca</i>	<i>O. orca</i>	<i>O. orca</i>	Macho
G166	HSF12	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G167	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G168	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G169	HBP5	<i>Balaenoptera physalus</i>	<i>B. physalus</i>	<i>B. physalus</i>	Fêmea
G170	HEA1	<i>Eubalaena australis</i>	<i>E. australis</i>	<i>E. australis</i>	Macho
G171	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G172	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G173	HT14	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G174	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G175	HSL14	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G176	HSL15	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G177	HSL16	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G178	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G179	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G180	HDD3	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. delphis</i>	Fêmea
G181	HDD1	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. delphis</i>	Fêmea
G182	HBB1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. brydei</i>	Fêmea
G183	HBA039	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G184	HGA036	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G185	HGA011	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Fêmea
G186	HBA058	<i>Megaptera novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	<i>M. novaeangliae</i>	Macho
G187	HBB1	<i>Balaenoptera brydei</i>	<i>B. brydei</i>	<i>B. brydei</i>	Fêmea
G188	HSL14	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G189	HSL17	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G190	HSL18	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G191	HPM1	<i>Physeter macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	Fêmea
G192	HSL15	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G193	HSL1	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G194	HSA1	<i>Stenella attenuata</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. attenuata</i>	Macho
G195	HSA3	<i>Stenella attenuata</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G196	HSA1	<i>Stenella attenuata</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G197	HSL15	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G198	HSL19	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G199	HSA2	<i>Stenella attenuata</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G200	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G201	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G202	HPM2	<i>Physeter macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	Fêmea
G203	HPM1	<i>Physeter macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	Fêmea
G204	HPM1	<i>Physeter macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	Fêmea
G205	HPM1	<i>Physeter macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	<i>P. macrocephalus</i>	Fêmea
G206	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G207	HSF18	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G208	HT4	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G209	HT4	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G210	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G211	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G212	HDD5	<i>Delphinus delphis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>D. delphis</i>	Macho
G213	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética DNA Surveillance	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G214	HSF8	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G215	HSL3	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G216	HSL18	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G217	HSL20	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G218	HSF5	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G219	HSF3	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G220	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G221	HSF19	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G222	HSF19	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G223	HSL21	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G224	HSL22	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G225	HSL23	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G226	HSF5	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G227	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G228	HT7	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G229	HSB3	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Fêmea
G230	HSB1	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Fêmea
G231	HSF18	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G232	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G233	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho

Amostras	Haplótipo	Identificação genética DNA Surveillance	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G234	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Fêmea
G235	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G236	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G237	HT5	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G238	HT2	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Fêmea
G239	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G240	HT12	<i>Tursiops truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. truncatus</i>	Macho
G241	HSF2	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G242	HSF7	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. capensis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G243	HSF5	<i>Stenella frontalis</i>	<i>D. delphis</i>	<i>S. frontalis</i>	Macho
G244	HSL1	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G245	HSL22	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G246	HSL3	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G247	HSL14	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G248	HSA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Macho
G249	HSA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G250	HSB2	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Macho
G251	HSB2	<i>Steno bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	<i>S. bredanensis</i>	Fêmea
G252	HPE1	<i>Peponocephala electra</i>	<i>P. electra</i>	<i>P. electra</i>	Fêmea
G253	HPE2	<i>Peponocephala electra</i>	<i>P. electra</i>	<i>P. electra</i>	Fêmea

Amostras	Haplótipo	Identificação genética <i>DNA Surveillance</i>	Espécie mais próxima no GenBank	Espécie identificada no campo	Sexagem molecular
G254	HPE3	<i>Peponocephala electra</i>	<i>P. electra</i>	<i>P. electra</i>	N/A
G255	HPE4	<i>Peponocephala electra</i>	<i>P. electra</i>	<i>P. electra</i>	Fêmea
G256	HSA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G257	HPE4	<i>Peponocephala electra</i>	<i>P. electra</i>	<i>P. electra</i>	Macho
G258	HSA1	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G259	HSA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Fêmea
G260	HSL24	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G261	HSL1	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G262	HSL14	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G263	HSL14	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G264	HSL2	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G265	HSL1	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Fêmea
G266	HSL25	<i>Stenella longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	<i>S. longirostris</i>	Macho
G267	HSA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	<i>S. attenuata</i>	Macho
G268	HSC1	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Macho
G269	HSC6	<i>Stenella clymene</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>S. clymene</i>	Macho

Anexo V.5.2-I: Relatório Executivo - Considerações sobre os Primeiros Resultados de Análises Químicas de Contaminantes (HPA) e Bio Contaminantes em Cetáceos, Obtidos no Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS

Relatório Executivo

Considerações sobre os Primeiros Resultados de Análises Químicas de Contaminantes (HPA) e Bio Contaminantes em Cetáceos, Obtidos no Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS

Outubro 2018 (revisão 01 - janeiro de 2019)

Profa. Dra. Angela de Luca Rebello Wagener
Depto de Química
PUC-Rio



Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Apresentação

O presente relatório, contratado pela empresa Socioambiental Consultores Associados, apresenta uma primeira análise dos resultados dos estudos de ocorrência de compostos orgânicos, HPA e Biomarcadores em cetáceos, no âmbito do desenvolvimento do **Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS**, executado para Petrobras pela empresa Socioambiental. O **PMC-BS** objetiva atender demanda do Processo de Licenciamento Ambiental - IBAMA Nº 02001.114289/2017-80 - conduzido pela Coordenação Geral de Licenciamento Ambiental de Empreendimentos Marinhos e Costeiros – CGMac, da Diretoria de Licenciamento Ambiental – DILIC, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

Os mencionados estudos de ocorrência de compostos orgânicos em cetáceos, HPA e Biomarcadores, foram realizados respectivamente pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP) e pelo Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC). Os dois laboratórios foram contratados pela Petrobras para a análise de amostras de biópsias de cetáceos coletadas no âmbito do **PMC-BS**. Os trabalhos dos laboratórios mencionados estão sendo desenvolvidos sob a responsabilidade dos profissionais Dr. Rafael André Lourenço (USP) e Afonso Bairy (UFSC).

A fonte de informações e dados que fundamentou a elaboração deste relatório, foram os 68 laudos emitidos pelo IO/USP (**Anexo 01**) sobre contaminantes, após análises das amostras coletadas pelo PMC-BS nos três primeiros anos do projeto. Para biomarcadores, foram considerados os seguintes relatórios do LABCAI/UFSC: “Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira, provenientes do PMP-BS e do PMC-BS - Relatório Técnico Anual - Versão 01 (de junho 2018)”; e “Serviço de Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira, provenientes do PMP-BS e do PMC-BS - Relatório de Acompanhamento Mensal – RAM 20 - Revisão 01”.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Objetivos do Projeto

O Objetivo dos estudos de contaminantes e Biomarcadores em cetáceos é um dos objetivos definidos no Projeto Executivo do PMC-BS, cujo objetivo geral é: *“Estabelecer bases metodológicas e de dados para o monitoramento de longo prazo de cetáceos na Bacia de Santos e de possíveis interferências sobre estes, gerando parâmetros para a avaliação de impactos potenciais das atividades de produção e escoamento de petróleo e gás, e de outras atividades antrópicas da área de abrangência”*. Neste sentido, esses estudos e o presente relatório buscam atender ao seguinte objetivo específico do projeto Executivo do PMC-BS: *“Avaliar o grau de contaminação existente em diferentes espécies de cetáceos por diferentes tipos de agentes químicos”*.

Introdução ao estado da arte

Os mamíferos marinhos estão sujeitos a uma diversidade de riscos derivados da atividade humana. Dentre estas pode-se citar a perda e degradação de habitat, o tráfego marinho, a captura acidental, a sobrepesca, a poluição química e acústica (García-Alvarez et al., 2014). De acordo com Tanabe (2002), a exposição a poluentes e resíduos está entre os riscos mais importantes, o que tem suscitado o crescente número de investigações (Kuehl et al., 1991; Aguilar e Borrell, 1994; Balmer et al., 2011; Kucklick et al., 2011) sobre a presença de contaminantes persistentes como causa relevante do declínio de populações.

Uma parcela significativa das investigações levadas a cabo em cetáceos utiliza a coleta de tecidos (gordura e pele) em animais encalhados e nestes se tem relatado presença de poluentes orgânicos persistentes (POPs) e, em alguns casos, de compostos liberados em processos de combustão incompleta, extração, transporte e processamento de petróleo (HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Por exemplo, Marsiliet al (2001) relatam concentrações de HPAs totais, não alquilados, em cetáceos entre 27,5 e 32.504 ng.g⁻¹ p. u.; Garcia-Alvarez et al (2014) relatam concentrações também para HPAs totais,

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

não alugados, em cetáceos entre 75 e 5.761 ng g⁻¹p.s., Cagnazzi et al (2013) reportam para cetáceos concentrações de HPAsna faixa de 3.247 a 10.917 ng g⁻¹ p.s. Camacho et al. (2012), que determinaram HPAs em outros vertebrados marinhos, salientam que concentrações mais elevadas encontradas em tecidos podem ter concorrido para a incidência de doenças que levam à morte do animal arribado e, assim, as informações obtidas retratariam casos isolados de exposição a elevadas concentrações que, portanto, são pouco representativos do estado da população. Porque uma fração importante do óleo é produzida a partir de poços situados no mar e é transportada via tanqueiros, a exposição de mamíferos marinhos diretamente ao óleo bruto pode se dar quando ocorrem acidentes. Esta exposição está associada à ocorrência de várias alterações, tais como: disfunção adrenal e aumento de doenças pulmonares (Schwacke et al., 2013; Venn-Watson et al., 2015), lesões cardíacas e gástricas (Stimmelmayer et al., 2018), redução do sucesso reprodutivo (Kellar et al., 2017), bloqueio do sistema imunitário (De Guise et al., 2017) e declínio de população (Matkin et al., 2008).

Para investigação da possível exposição a componentes do óleo ou aos HPAs, uma tendência crescente de realizar-se investigações em animais vivos, através da extração de amostras de biópsia com auxílio de dardos, em condições que minimizam possíveis riscos para a saúde do animal. Em função do elevado custo destas amostragens, há ainda um número reduzido de investigações que utilizam essa abordagem amostral (Balmer et al., 2011; Fair et al., 2010; Formigaro et al., 2014; Kucklick et al., 2011; Yordy et al., 2010).

No que se refere ao petróleo, golfinhos, particularmente, apresentam potencial elevado de exposição quando da ocorrência de um derrame ou liberações diretas no ambiente marinho, através do contato com a superfície da coluna de água, ingestão acidental a partir da água ou sedimentos no ato da alimentação, ou ainda pela ingestão de presa contaminada. Golfinhos respiram imediatamente acima da interface ar-água e podem, assim, também sofrer

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

exposição aos compostos voláteis do petróleo ou associados a aerossóis (Schwacke et al, 2013).

Componentes do petróleo, mas também originados na combustão incompleta, os HPAs derivados da atividade antrópica parecem causar aumento de mortalidade, incidência de doenças e bloqueio da reprodução em diversos cetáceos, segundo relatos na literatura especializada (Martineau et al., 2002; Swart et al., 1996; Frouin et al., 2010; Aguilar e Borrell, 1994; Jepson et al., 2005; Venn-Watson et al., 2015). Há evidências da correlação entre altos níveis de certos HPAs (principalmente benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno) no ambiente e o aumento de incidência de carcinogênese e mutagênese em organismos expostos a estes compostos (NRCC, 1983), em especial aos mamíferos que possuem mecanismos de biotransformação. É o seu caráter lipofílico que propicia a penetração através de membranas biológicas e acumulação no organismo exposto. A United States Environment Protection Agency, USEPA, identificou como poluentes prioritários 16 HPAs: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fenantreno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenz(ah)antraceno, e benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3, cd)pireno. O benzo(a)pireno parece ser o potencialmente mais agressivo dentre os acima listados e há evidências, já em trabalhos publicados no início da década de 1990, da ação pro carcinogênica de seus metabólitos e de seus efeitos danosos sobre o DNA (Carvan, M.J. III, 1993). Recentemente a US-Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSD, 2017) publicou uma lista de substâncias potencialmente danosas pela ação carcinogênica e mutagênica, na qual os HPAs encontram-se entre as 10 de maior risco.

Os HPAs são hidrocarbonetos aromáticos constituídos por dois a sete anéis benzênicos fundidos, os quais podem conter cadeias hidrocarbônicas (grupos alquila) ramificadas. A maioria dos HPAs é formada através de processos de decomposição térmica seguida de recombinação de moléculas orgânicas. Os processos digenéticos que ocorrem à baixa temperatura

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

produzem os HPAs contidos no petróleo. Alguns HPAs são produzidos por atividade biológica.

Os HPAs de origem pirolítica se distinguem daqueles petrogênicos pela preferência na geração dos compostos não substituídos (parentais) em relação àqueles que apresentam cadeias carbônicas laterais. Assim, ao se determinar os compostos parentais e seus derivados substituídos em produtos da combustão incompleta da matéria orgânica, verifica-se que a expressão gráfica da distribuição de concentração tem a forma de uma rampa onde $C_0 > C_1 > \dots > C_n$ (n é o número de átomos de carbono na cadeia lateral). No caso do óleo, nota-se um formato de sino, ou seja, há um máximo de concentração num dos compostos intermediários entre C_0 e C_n . Após liberação no meio ambiente, solos, sedimentos ou água, o óleo sofre transformações que alteram esta característica e a expressão gráfica de concentração torna-se oposta àquela dos resíduos da combustão, ou seja, $C_0 < C_1 < \dots < C_n$. Isto se dá porque os compostos alquilados são mais persistentes e a degradação dos de maior massa molecular é mais lenta. Estas características da fração aromática são obtidas através da homogeneização da amostra, separação dos analitos por processo de extração em solventes apropriados, que pode ser tradicional ou em equipamentos avançados, concentração dos extratos seguida da quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

A razão entre concentrações de certos pares ou grupos de HPAs tem sido utilizada na área forense ambiental voltada a investigar a presença de óleo no meio ambiente, sedimentos, particulado atmosférico, solos e águas, (Wang, et al, 1997, Wang et al, 1999, Yunker et al, 2002), mas hoje a aplicação de técnicas estatísticas, gráficas e “fuzzi logics” (Wagener et al, 2010 e 2012; Massone et al, 2015; Mauad et al, 2015) fornece resultados mais confiáveis para distinção de HPAs de origem petrogênica daqueles de origem pirolítica em amostras dos substratos acima citados. No caso dos HPAs encontrados em tecidos biológicos a aplicação de razões diagnósticas e interpretação de perfis cromatográficos requer cuidados, já que os processos de absorção, transformação e excreção podem alterar substancialmente os padrões de distribuição acima discutidos.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Alguns autores (García-Alvarez et al, 2014a) encontraram em amostras de biópsia de mamíferos marinhos da região da Ilhas Canárias, no Atlântico Leste, maiores concentrações e maior frequência de incidência de HPAs de baixa massa molecular (di, tri e tetra-cíclicos), com predominância de fenantreno. Em áreas (Marsili et al, 2001) do Mediterrâneo, especificamente no Mar da Ligúria e Mar Iônico, encontraram-se diferentes tipologias dos HPAs, com a predominância se estendendo do naftaleno até o pireno (Figura 1), o que se pode compreender em função da metabolização eficiente dos compostos.

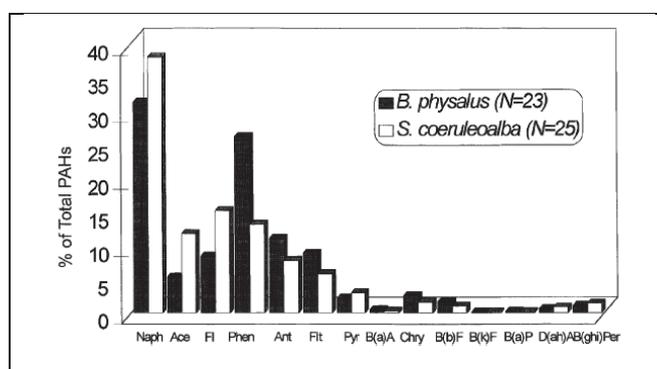


Figura 1. Tipologia de HPAs em cetáceos do Mar Mediterrâneo. Figura extraída da publicação de Marsili et al, 2001.

Assim, a diferença de tempo entre a exposição e a coleta dos tecidos a serem avaliados pode causar diferenças de concentração, mas também de tipologia dos HPAs. Garcia-Alvarez (2014a), por exemplo, sugere que amostragens eventuais, por períodos curtos de tempo, geram resultados segmentados que refletem apenas uma exposição próxima ao período da amostragem.

Wetzel et al (2008) estudaram a presença de HPAs em biópsia de peixe boi marinho coletada na Florida e no México. Em animais de ambos os locais, os HPAs se encontraram abaixo do LD (limite de detecção: 10 ng g⁻¹ de lipídios). Os autores atribuem à baixa massa lipídica amostrada, pois a amostra se constituiu principalmente de derme, a não detecção de HPAs em animais provenientes de uma região de sedimentos contaminados por HPAs no México (Barroso et al, 1998).

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Fair et al (2010) usando os métodos descritos por Wetzel et al (2008) determinaram 45 HPAs (os parentais, os substituídos e os dibenzotiofenos) em gordura de 28 golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) amostrados na Indian River Lagoon, Florida, entre 2003 e 2005, e em duas regiões estuarinas do sudeste dos EUA. Foram coletadas gorduras de organismos vivos, anestesiados, 0,7 a 1,0 g de tecido gorduroso. As concentrações médias em 17 organismos das regiões estuarinas foi de 3010 ng g⁻¹HPAs e a faixa de variação foi de < 10ng g⁻¹em 5 amostras a 9140 ng g⁻¹. O naftaleno e seus compostos substituídos foram os únicos compostos detectados. Esses autores atribuem a ausência dos demais HPAs à capacidade de metabolização e excreção destas substâncias em mamíferos. Os autores indicam que os resultados encontrados são semelhantes àqueles reportados por Hellou et al (1990) para baleias do Atlântico Noroeste.

Garcia-Alvarez et al (2014b) determinaram os 16 HPAs prioritários da USEPA em gordura de golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) provenientes das Ilhas Canárias, Espanha. Amostras foram coletadas através de dardos a partir de 57 animais vivos, entre 2003 e 2011. De acordo com os autores, a limitação do método remoto de coleta das biópsias é que não se pode obter dados confiáveis sobre o sexo e idade dos animais. Amostras de 0,03 a 0,31 g de gordura foram obtidas e homogeneizadas picotando-as com tesoura e em seguida tratando em Ultra-turax. O LD obtido para os compostos de interesse não é reportado. Fenantreno foi encontrado em maiores concentrações e em 100% das amostras (média: 5278 ng g⁻¹), seguido do pireno (média: 3295 ng g⁻¹), naftaleno (média: 1873 ng g⁻¹) e criseno (média: 1267 ng g⁻¹), que também foram detectados em 95 a 100% das amostras. Todos os 16 HPAs foram encontrados em algumas das amostras, mas com menor frequência o antraceno (14% das amostras), o dibenz(ah)antraceno (3% das amostras) e o benzo(ghi)perileno (3% das amostras). A Figura 2, abaixo, extraída do artigo de Garcia-Alvarez et al (2014b) demonstra o predomínio de HPAs di-, tri- e tetra-cíclicos. Os HPAs encontrados neste estudo correspondem a um perfil de baixa toxicidade, pelo menos no que tange à ação carcinogênica, uma vez que são,

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

em sua maioria, compostos de baixa massa molecular. Os compostos indicados pela USEPA como prováveis carcinogênicos estão principalmente na faixa de alta massa molecular.

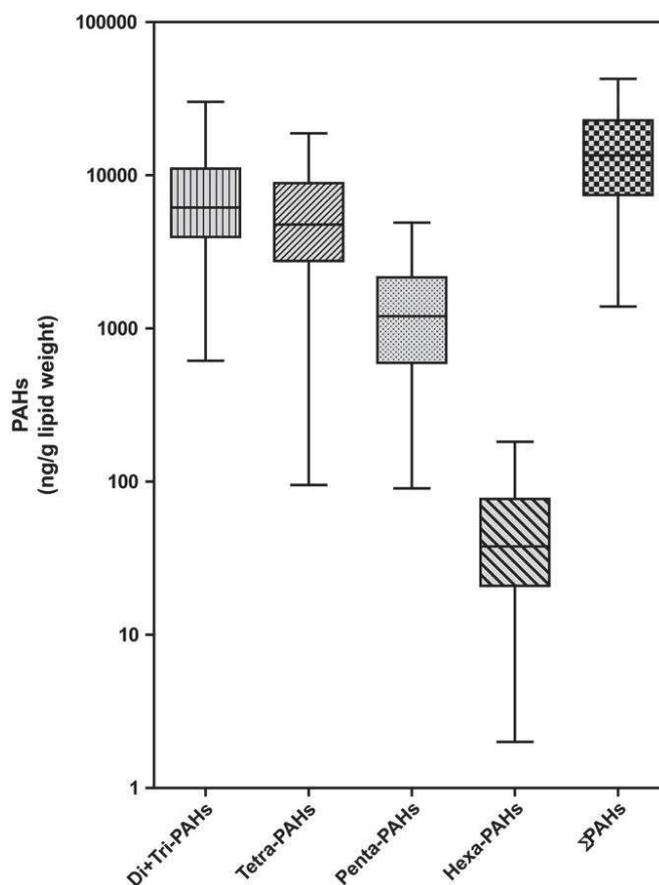


Figura 2. Predomínio de diferentes grupos de HPAs em cetáceos do Atlântico Leste conforme descrito por Garcia-Alvarez et al (2014b). Figura original do artigo de Garcia-Alvarez et al (2014b).

Leung et al (2005) determinaram HPAs em gordura de 10 golfinhos *Sousa chinensis*, coletada em região estuarina a noroeste de Hong Kong, com auxílio de dardos. A região estudada é considerada alterada e ali há fontes importantes de HPAs petrogênicos e pirolíticos. Amostras de gordura de 0,2x0,2x0,2 cm foram obtidas e 15 HPAs foram ali determinados: naftaleno, acenaftileno,

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b) fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno (123-cd) pireno, dibenzo (1,2,5,6)-perileno e benzo(ghi) perileno. As concentrações totais (soma dos 15 HPAs detectados) reportadas para as três regiões amostradas situaram-se na faixa de 2761 a 6751 ng g⁻¹. Todos os compostos foram detectados (LD não reportado), mas houve predominância de naftaleno em duas das regiões amostradas. O esquema na Figura 3, obtida do artigo original, mostra esta preferência em dois dos locais amostrados, enquanto em Xiamen há predomínio de HPAs de mais alta massa molecular, o que indica aportes mais importantes a partir de fontes pirolíticas. Os autores argumentam que, em geral, há predomínio dos HPAs de baixa massa molecular, como o naftaleno e o acenaftileno, em função da sua maior facilidade de absorção pelo organismo.

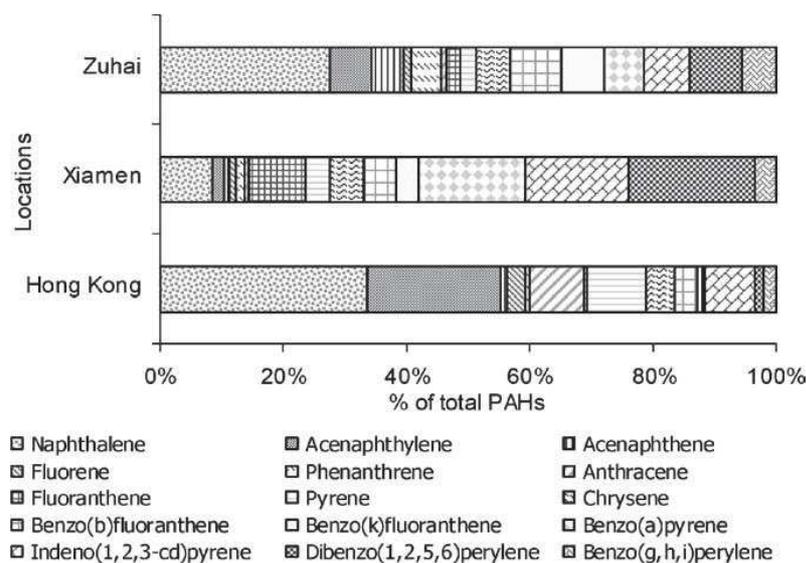


Figura 3. Incidência de HPAs (%) em amostras de gordura de golfinhos provenientes de regiões estuarinas do sul da China. Figura original do artigo de Leung et al (2005).

Weitjs et al, 2016 estudaram a presença de vários contaminantes, incluindo HPAs, em golfinhos *Sousa sahulensis* residentes em enseadas urbanizadas da Austrália e cuja população haviam sofrido eventos de mortandade. As análises usaram de tecidos presentes em arquivo (gordura, fígado, rins e pele) e foram objetos de estudo os 16 HPAs da USEPA. A

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

determinação se deu em equipamentos de alta resolução (HRGC-HRMS, Thermo Trace GC Ultra acoplado a um Thermo DFS) e a quantificação se deu por diluição isotópica. Tais técnicas permitem um elevado grau de sensibilidade e resolução. O limite de quantificação (LQ) reportado variou de 0,13 ng g⁻¹ (benzo(a)pireno) a 18 ng g⁻¹ (naftaleno). Os dados reportados para gordura de três animais foram: para dois dos animais <LQ ; e para o terceiro relatam 54 ng g⁻¹ para naftaleno, 22 ng g⁻¹ para fenantreno, 3,1 ng g⁻¹ para fluoranteno, 1,1 ng g⁻¹ para antraceno e 0,83 ng g⁻¹ para acenaftileno. Os autores justificam as concentrações não detectadas ou baixas, apesar de existirem relatos de altas concentrações de HPAs nas águas estuarinas onde os animais habitam, em função da rápida metabolização e excreção dos compostos. Citam que Martineau et al (2002) encontraram altas concentrações de aduto de benzo(a)pireno-DNA em baleias Beluga, pois se alimentam de organismos bênticos e os espécimes estudados encontravam-se em área de sedimentos contaminados (HPA totais: 500–4.500 ppbp.s.). Altas concentrações (87 – 620 ng g⁻¹ de lipídio) foram encontradas em golfinhos *Sousa sahalensis* e *Orcaella heinsohni*, em região na Austrália sob influência de indústrias de mineração de gás e carvão (Cagnazzi et al, 2013).

O presente relatório não se propõe a realizar uma ampla revisão bibliográfica, o que já foi realizado pelos laboratórios que conduzem o projeto, mas sim apresentar alguns achados que mostram a complexidade das informações ambientais, relativas aos HPAs, quando se tratam de organismos que podem metabolizar e excretar os compostos, mesmo quando há registro de contaminação na água. Em regiões prístinas é ainda mais reduzida a eventual identificação de sinais detectáveis dos HPAs nestes organismos.

No entanto, a avaliação de biomarcadores, que faz parte dos objetivos do projeto, poderá contribuir para avaliação das potenciais respostas biológicas dos mamíferos marinhos à exposição dos HPAs e compostos presentes no ambiente.

Infelizmente, isto requer, nas condições ideais, que se obtenham amostras de órgãos internos.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Os HPAs apresentam relativamente baixa toxicidade e são os processos naturais, que se destinam à eliminação da substância estranha ao organismo, que os tornam mais tóxicos. A formação de metabólitos reativos (como epóxidos e dihidrodíóis) em animais e, portanto, a toxicidade potencial, é inversamente proporcional à capacidade do sistema metabólico do organismo (sistema oxidase de função mista, MFO). Em mamíferos o processo de biotransformação ocorre no fígado e através dele o toxicante hidrofóbico torna-se mais hidrofílico, podendo ser eliminado do corpo do organismo (Panti et al., 2011). No entanto, como acima citado, os metabólitos reativos podem ser potencialmente mais tóxicos do que os HPAs originais, pela capacidade de formar ligação com proteínas celulares e DNA, o que pode levar a mutações, malformações e ao câncer. Uma porcentagem do toxicante original pode ficar estocado, porém, nos tecidos adiposos, mesmo na presença de ação do MFO. Organismos com alto conteúdo de lipídios e baixa atividade do MFO acumularão os compostos parentais, não biotransformados, enquanto, aqueles, como cetáceos, que possuem um sistema MFO eficaz, tenderão a excretar o toxicante biotransformado, embora seja reportada a acumulação de HPAs no tecido gorduroso (Fossi et al, 1992; Ben-David et al, 2001; Pati et al., 2011).

A determinação de concentração de contaminantes em tecidos biológicos é importante para a avaliação da presença das substâncias potencialmente tóxicas no ambiente e de sua penetração na teia alimentar. No entanto, é crescente o número de estudos que incluem determinações de indicadores dos efeitos dessas substâncias no organismo. Estes indicadores são também chamados biomarcadores e expressam repostas dos organismos vivos, que podem representar desde a exposição a contaminantes até os efeitos danosos da exposição. No mínimo, o biomarcador indica presença de contaminantes no ambiente, mas também que o organismo o absorveu e em que nível se encontram as alterações danosas (Hoffman et al., 2003).

Há vários biomarcadores de exposição/efeito que vem sendo estudados com o intuito de identificar o impacto de contaminantes químicos em organismos. No caso de exposição a HPAs e a outros contaminantes (dioxinas, PCBs, etc)

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

há indução dos citocromos hepáticos P450, uma classe de hemoproteínas presentes em todos os tecidos, mas especialmente em altas concentrações no fígado. Os dois tipos principais de citocromos P450 induzidos por contaminantes são aqueles descritos como 3-metilcolantreno induzido (CYP1A) e fenobarbital induzido (CYP2B). A regulação da família do CYP1A é mediada pelo receptor arila (AHR) que apresenta afinidade por diversos contaminantes químicos, entre eles os HPAs. A toxicidade de um componente químico está ligada ao seu grau de afinidade pelo receptor arila. A ligação do contaminante a esse receptor resulta na indução de citocromo P450 1A e da enzima 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD). Métodos sensíveis e otimizados devem ser usados para distinguir os citocromos constitutivos dos induzidos.

A glutatona S-transferase (GST) catalisa a desintoxicação de uma variedade de substâncias xenobióticas e de seus metabólitos produzidos no metabolismo oxidativo através do CYP1A. Estudos têm demonstrado que o aumento da atividade de GST em diferentes organismos pode ser usado como biomarcador da contaminação química e de sua expressão tóxica (Jimenez and Stegeman 1990; Otto e Moon, 1996; Gadagbui et al. 1996; Burgeot et al. 1996).

Um outro indicador da resposta do sistema enzimático CYP1A resulta da determinação da atividade da enzima etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e que tem sido utilizada para avaliação do impacto de contaminantes em peixes e outros organismos (Goksoyre Forlin, 1992; Whyte et al., 2000; van der Oost et al., 2003).

Após incorporação nos organismos, alguns toxicantes ou/e seus metabólitos podem interagir com o DNA modificando-o ou causando danos. HPAs passam por ativação metabólica a diolepóxidos, os quais se ligam covalentemente ao DNA. Os mecanismos da ativação metabólica de HPAs estão bem estabelecidos há mais de 50 anos (Baird e Ralston, 1997; Harvey, 1991) e envolvem três reações mediadas por enzimas: oxidação de uma dupla ligação a óxidos arinos instáveis, catalisada por enzimas P450 (CYPs); hidrólise dos óxidos arinos a trans-dihidrodióis por epóxido-hidrolase microssomal; e uma segunda oxidação catalisada por CYP na dupla ligação adjacente à função diol

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

gerando um diolepóxido vicinal. Esta rota pode levar à formação de uma conformação de “baía” ou “fiorde” (Figura 4) e os dioisepóxidos nestas conformações podem ligar-se eletrofilicamente ao DNA enquanto alguns dos estereoisômeros de diolepóxidos de HPA são carcinogênicos. Alguns dos HPAs metabolizados por estas vias são: benzo(a)pireno (Dipple et al., 1984; Gelboin, 1980), criseno (Mordquist et al., 1981), 5-metilcriseno (Hecht et al., 1986), fenantreno, benzo(c)fenantreno (Dipple et al., 1987), benz(a)antraceno (Levin et al., 1978), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (Slaga et al., 1979) e dibenzo(a,l)pireno (Ralston et al., 1994; 1995). Quando os mecanismos de reparo do DNA são afetados pela velocidade de formação, o resultado é uma acumulação de mutações no DNA que podem induzir carcinogênese. O número de adutos formados relaciona-se ao grau de exposição ao HPA, ao estágio de vida do organismo quando da exposição, concentração e perfil genético dos HPAs, entre outros fatores. A exposição a HPAs provoca diversas respostas a nível molecular e celular, as quais modificam o ambiente endógeno, induz genes envolvidos no apoptose, controle do ciclo celular e reparo do DNA (Harvey, 1991; Baird e Ralston, 1997; Farmer, et al, 2003; Xue e Warshawsky, 2005; Ewa e Danuta, 2017).



Figura 4. Regiões de “baía” e de “fiorde” em diferentes HPAs.

A avaliação destas interações baseia-se na medição direta do dano estrutural do DNA, verificação de reparo no DNA ou presença de mutações em genomas. Conforme citado acima as formas ativadas de HPAs podem estabelecer ligações

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

covalentes com o DNA, portanto a verificação da presença de alterações indica possível exposição.

Observações sobre resultados já obtidos

Biomarcadores

O conjunto de biomarcadores acima citados de forma breve fazem parte integrante do presente projeto. A investigação está em fase avançada no que tange o estabelecimento das condições ideais e padronização para aplicação dos testes aos tecidos já amostrados. Esta é uma etapa crítica para garantia da qualidade dos resultados a se obter (*Padronização de Técnicas e Análises de Biomarcadores em Espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira provenientes do PMP-BS e PMC-BS*, Petrobrás, junho de 2018). Na ausência de resultados de biomarcadores para os animais, cujos tecidos foram sujeitos à análise química para determinação dos HPAs nesta fase, ainda não é possível pesquisar eventuais relações entre o observado através dos marcadores e os dados químicos.

Segundo o referido relatório de “Padronização de Técnicas e Análise de Biomarcadores (...)”, descreve-se a seguir a seleção de espécies definidas para os estudos. Dentre os cetáceos marinhos, está previsto o sequenciamento do transcriptoma de duas espécies, uma da subordem Odontoceti e outra da subordem Mysticeti. Portanto, com o intuito de identificar potenciais espécies de cetáceos para o desenvolvimento dos transcriptomas, foi realizado um levantamento de todas as amostras obtidas para biomarcadores moleculares durante as campanhas 1 a 6 de Avistagem Embarcada e as campanhas 1 a 6 de Telemetria realizados no âmbito do PMC-BS. No total, 244 espécimes de 17 espécies foram amostrados ao longo dos seis ciclos de campanhas do PMC-BS. Destes, 197 indivíduos pertencem a 14 espécies da subordem Odontoceti, e 47 espécimes pertencem a sete espécies da subordem Mysticeti.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Frente aos resultados apresentados no PMC-BS, as espécies *Stenella frontalis*, *Tursiops truncatus* e *S. longirostris* representam, respectivamente, 32,5%, 19,3% e 23,8% dos odontocetos biopsados. Dentre os mysticetos, a baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) representa 29,8% dos animais amostrados, seguida da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) com 29,8% das amostragens realizadas no PMC-BS e da baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*) com 17% das amostragens realizadas no PMC. Portanto, até o momento, estas seis espécies possuem indivíduos biopsados com número amostral satisfatório para o desenvolvimento dos transcriptomas. Entretanto, como somente uma espécie de cada subordem será escolhida, fez-se uma busca no banco de dados do NCBI por sequências de genes e proteínas das cinco espécies de cetáceos marinhos. Destes, *T. truncatus* apresentou a maior quantidade de sequências, com 131.061 sequências de nucleotídeos e 54.358 sequências de proteínas depositadas no NCBI. Vale ressaltar que o transcriptoma desta espécie já foi sequenciado em amostras de sangue (MOREY et al., 2016) e pele (VAN DOLAH et al., 2015), corroborando com o grande número de sequências identificadas. Ainda, 19 sequências referentes aos genes que codificam as proteínas citocromo P4501A (CYP1A), fator de transcrição E2F, chaperona HSP70, receptor de estrogênio (ER), receptor de aril hidrocarboneto (AhR) e UDP-glicuroniltransferase (UDPGT) foram identificadas para *T. truncatus* no mesmo banco de dados. Portanto, pode-se concluir que para *T. truncatus* já se encontram disponíveis as sequências de genes previamente selecionados como biomarcadores moleculares, sem a necessidade de sequenciamento do transcriptoma.

Por outro lado, para as demais espécies com boa amostragem, *S. frontalis*, *S. longirostris*, *B. borealis*, *M. novaeangliae* e *B. brydei*, um pequeno número de sequências encontram-se disponíveis. Cabe ressaltar que grande parte das sequências identificadas se referem a genes e/ou proteínas mitocondriais, com nenhuma relação aos genes pré-definidos como potenciais biomarcadores moleculares para os tetrápodes marinhos, com exceção da sequência identificada para AhR em baleia-jubarte (Código de Acesso no

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

GenBank/NCBI 118419961). Portanto, as informações apresentadas, associadas ao número amostral disponível até o momento, reforçam o uso dos odontocetos *S. frontalis* ou *S. longirostris*, e dos mysticetos *B. borealis* ou *B. brydei* como espécies prioritárias para o sequenciamento de transcriptoma visando a identificação de genes biomarcadores moleculares de exposição a contaminantes ambientais.

Destaca-se que inicialmente foi utilizada a quantidade de amostras coletadas e entregues pelo PMP e PMC-BS até dezembro de 2017, sendo que as espécies *S. frontalis*, *B. borealis* e *T. truncatus* foram recomendadas como espécies-alvo de cetáceos para o monitoramento dos biomarcadores moleculares. Entretanto, após a atualização da quantidade de amostras disponível para cada espécie (maio de 2018) e consulta à equipe técnica do PMC-BS, que esclareceu questões de uso de habitat, hábitos migratórios e alimentares de cetáceos, decidiu-se pela revisão da proposta, conforme apresentado na reunião realizada com o IBAMA em 07/05/2018, tendo sido proposta a substituição de *S. frontalis* por *S. longirostris* e de *B. borealis* por *B. brydei*.

Em termos ecológicos, o golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) é encontrado no Oceano Atlântico, desde o sul do Brasil e até a costa oeste da África, tanto em regiões costeiras até águas oceânicas profundas, onde geralmente se desloca em busca de cardumes de peixes migratórios. Não é considerada uma espécie migratória, e apresenta hábito alimentar diverso, alimentando-se preferencialmente de peixes epi e mesopelágicos, além de lulas e invertebrados bentônicos (LOPES et al., 2012). De acordo com a Lista Vermelha da IUCN, há dados insuficientes para estabelecer o seu estado de conservação (HAMMOND et al., 2012).

Similarmente, para o golfinho-rotador (*S. longirostris*) ainda não está estabelecido o estado de conservação da espécie (BEARZI et al., 2012). Entretanto, sabe-se que se trata de uma espécie com ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os oceanos dos hemisférios norte e sul.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Embora geograficamente bem distribuído, este pequeno cetáceo parece ter preferência por áreas de talude continental, sobrepondo-se às áreas de exploração da Bacia de Santos (PETROBRAS, 2017).

Em relação aos misticetos, a baleia-sei (*B. borealis*) caracteriza-se por apresentar uma ampla distribuição geográfica, sendo subdividida em duas subespécies. Apresenta um comportamento migratório ao longo da costa brasileira que é desconhecido, e se alimenta de copépodos, eufasídeos e anfípodos. Em função da captura ostensiva entre as décadas de 1950 e 1980, as populações declinaram de forma vertiginosa, sendo atualmente considerada como uma espécie ameaçada de extinção pela IUCN (REILLY et al., 2008a). A segunda provável espécie de misticeto para desenvolvimento e análise de biomarcadores moleculares, a baleia-de-bryde (*B. brydei*) é considerada “deficiente em dados” pela IUCN (REILLY et al., 2008a) e, ao contrário do comportamento observado para os demais misticetos, não apresenta hábito migratório, permanecendo na costa brasileira ao longo do ano onde se alimenta de recursos da nossa costa (PETROBRAS, 2017). Por outro lado, a terceira provável espécie de misticeto para desenvolvimento e análise de biomarcadores moleculares, a baleia-jubarte (*M. novaeangliae*) é considerada “pouco preocupante” em termos de conservação (REILLY et al., 2008b), devido à significativas ações conservacionistas em todo o mundo. Esta espécie cosmopolita caracteriza-se por ser migratória, com períodos de migração bem definidos entre as áreas de alimentação e reprodução (ANDRIOLO; ZERBINI, 2010). Assim elegeu-se como espécie-alvo a baleia-de-Bryde por ser a única a se alimentar principalmente em águas brasileiras e de ocorrência ampla na Bacia de Santos.

Dentre as potenciais espécies-alvo de cetáceos delineadas acima, iniciou-se a padronização de análise de biomarcadores moleculares apenas para *T. truncatus*, tendo em vista a existência de sequências gênicas para esta espécie depositadas no GenBank.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

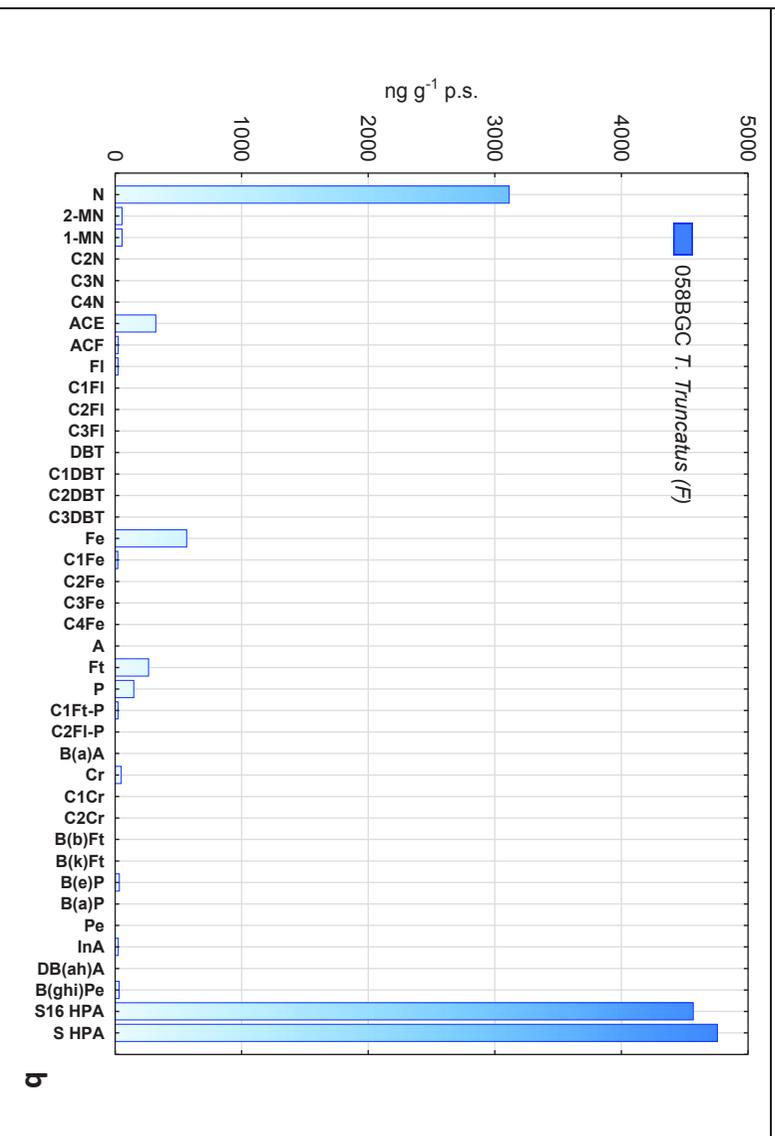
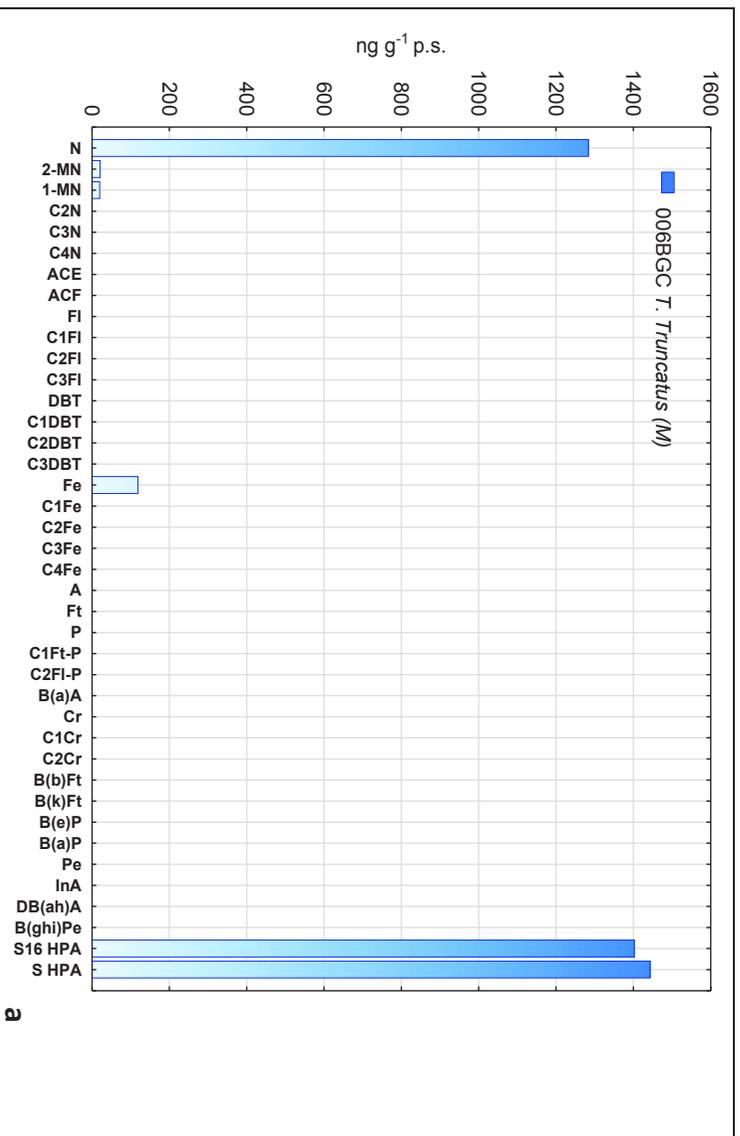
Análises Químicas

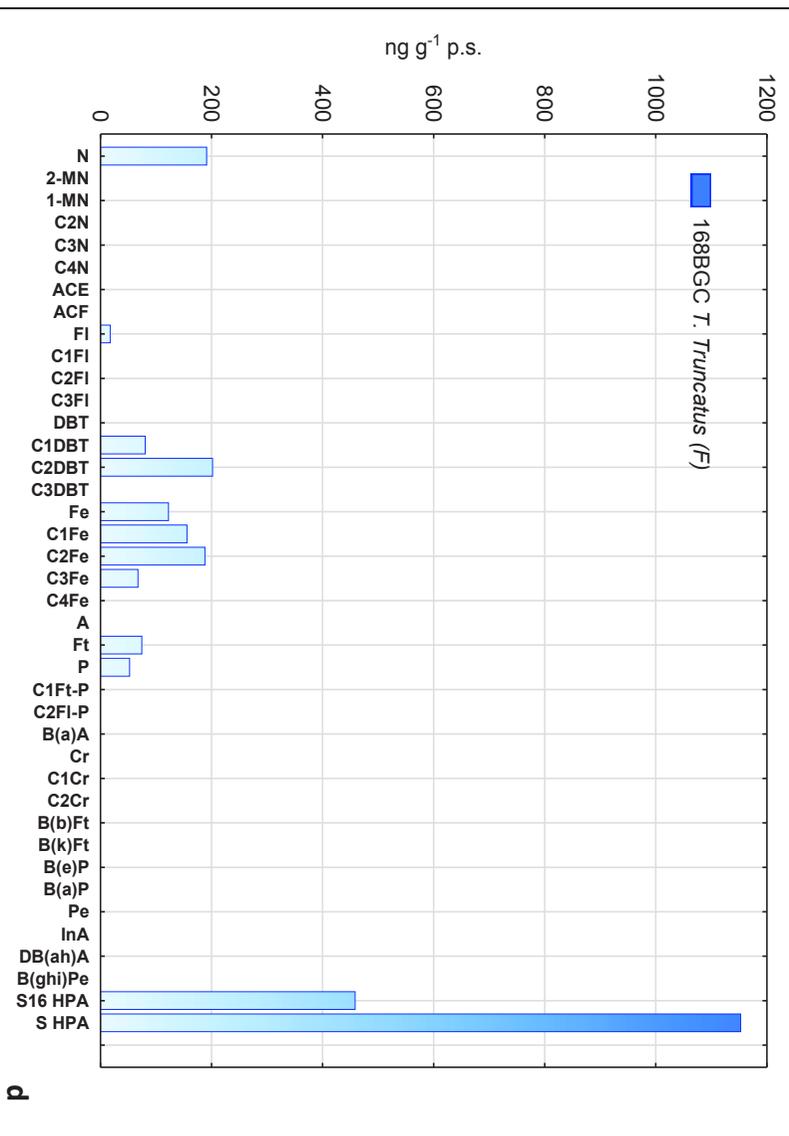
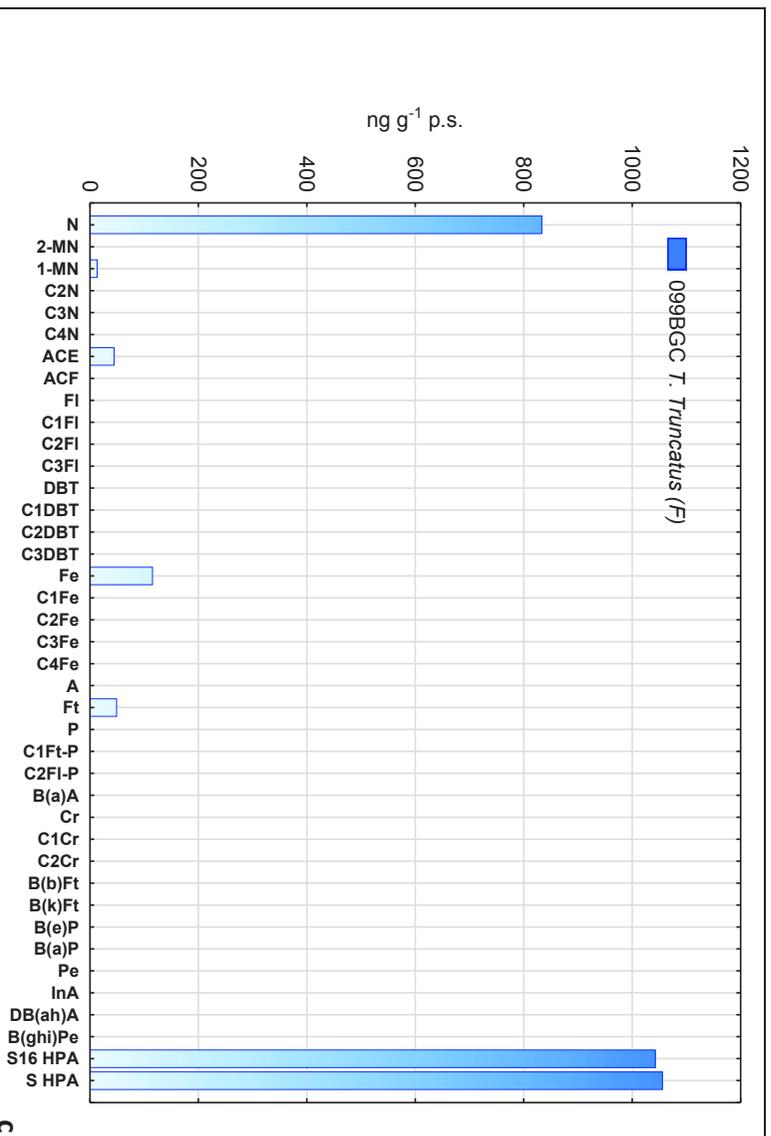
No que tange as análises químicas, os métodos encontram-se estabelecidos, já tendo sido obtidos resultados para os tecidos dos animais amostrados (gordura). Os seguintes compostos foram objeto das análises, conforme informado nos laudos emitidos pelo laboratório responsável: naftaleno, 2-metilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, C2-naftaleno, C3-naftaleno, C4-naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, C1-fluoreno, C2-fluoreno, C3-fluoreno, dibenzotiofeno, C1-dibenzotiofeno, C2-dibenzotiofeno, C3-dibenzotiofeno, fenantreno, C1-fenantreno-antraceno, C2-fenantreno-antraceno, C3-fenantreno-antraceno, C4-fenantreno-antraceno, antraceno, fluoranteno, pireno, C1-fluoranteno-pireno, C2-fluoranteno-pireno, benzo(a)antraceno, criseno, C1-criseno, C2-criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

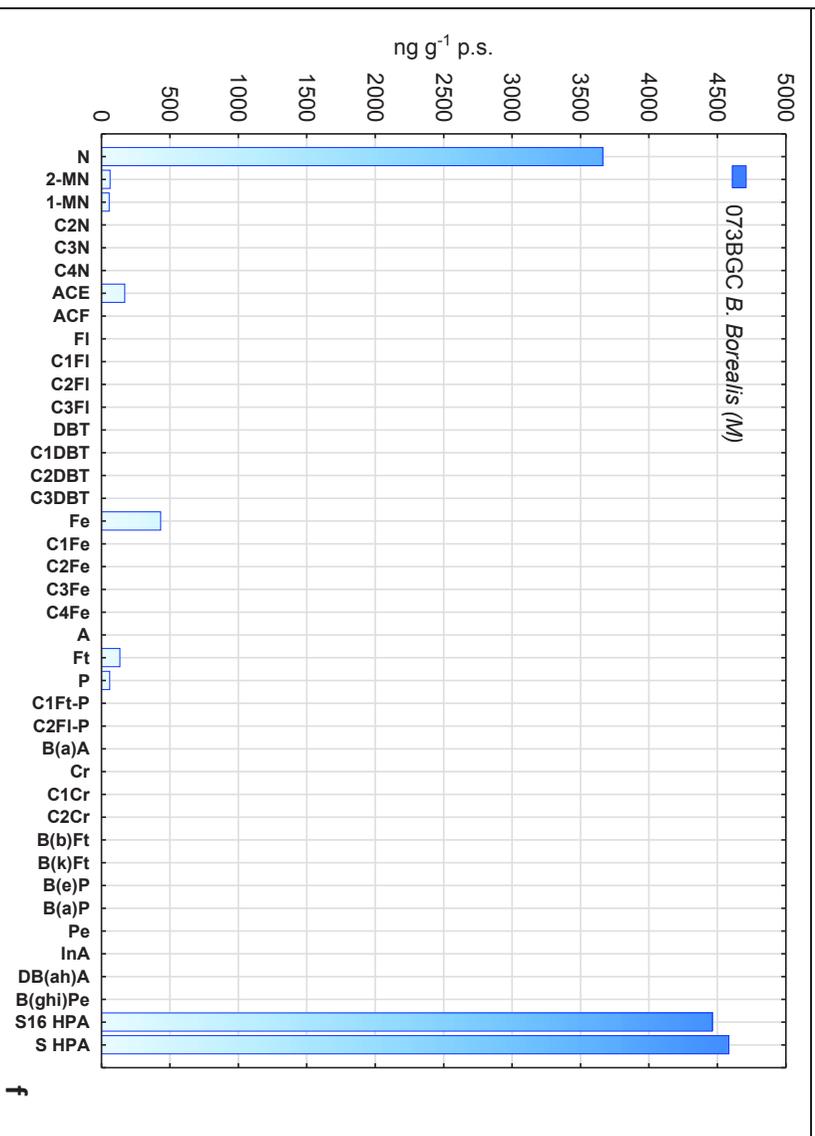
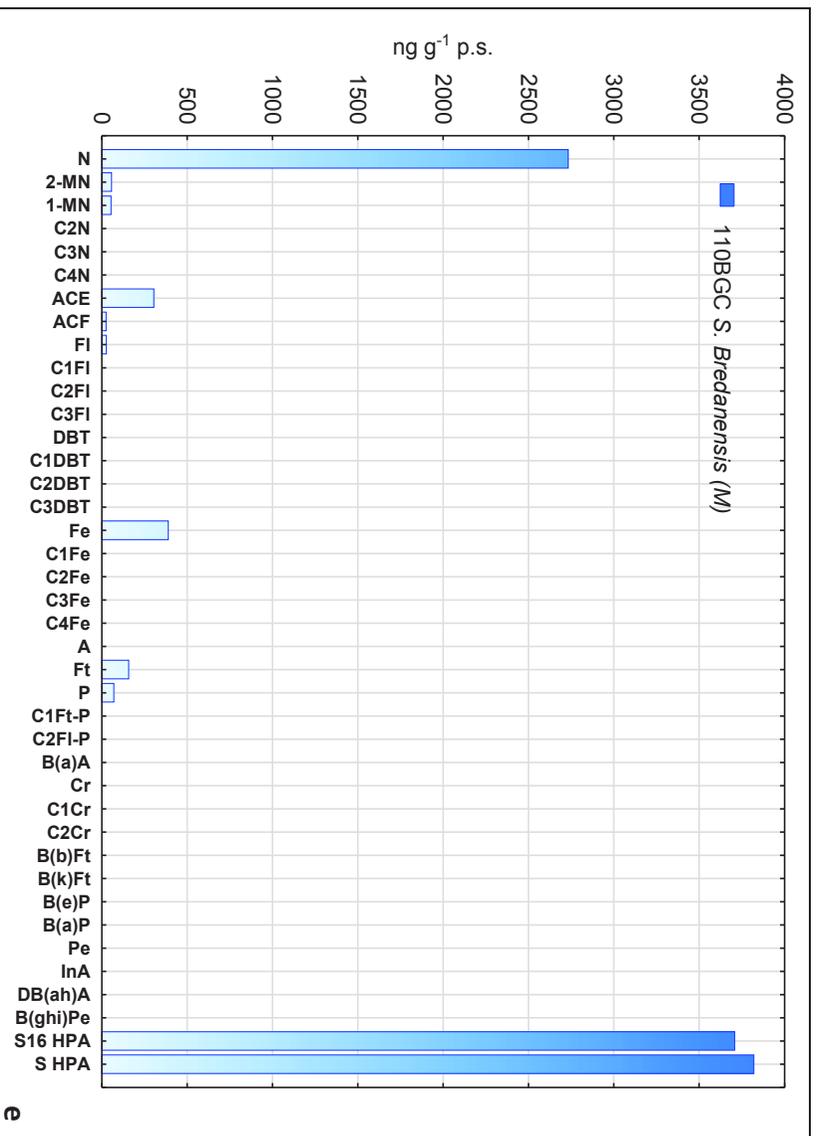
Os métodos utilizados baseiam-se naqueles descritos pela USEPA com adaptações conforme a literatura citada nos laudos emitidos pelo IO/USP.

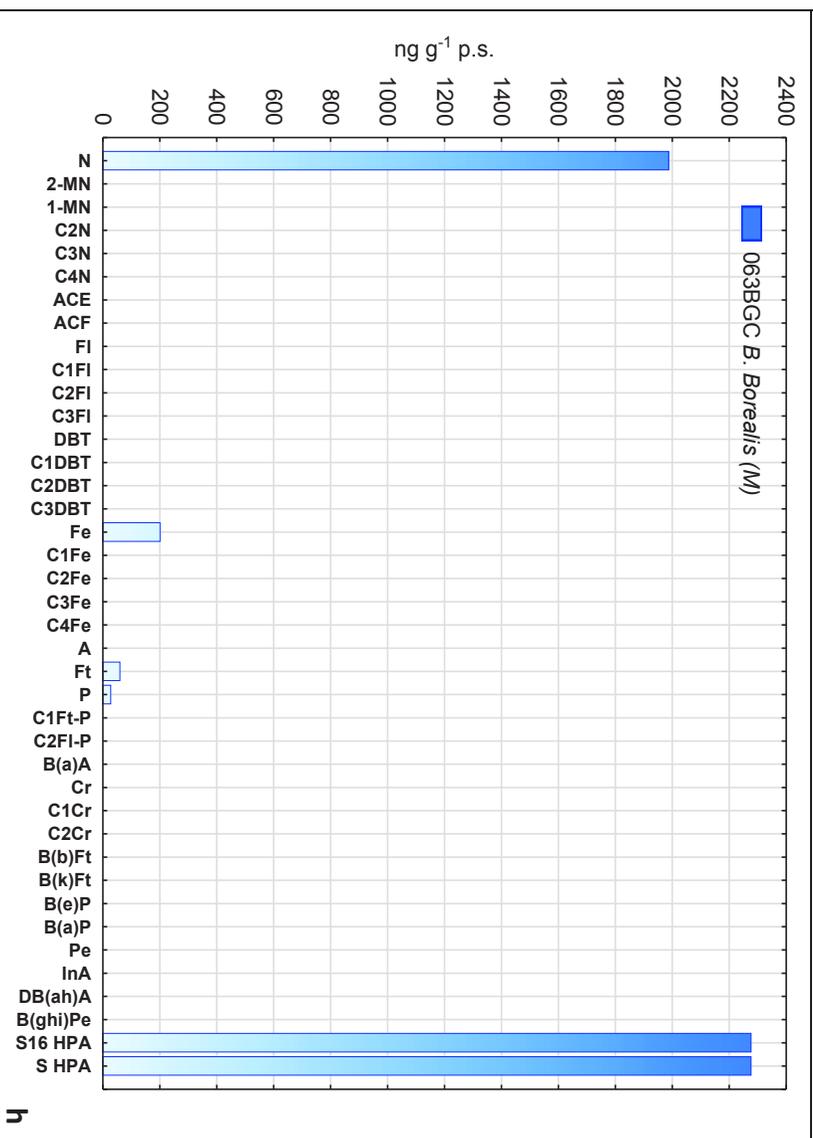
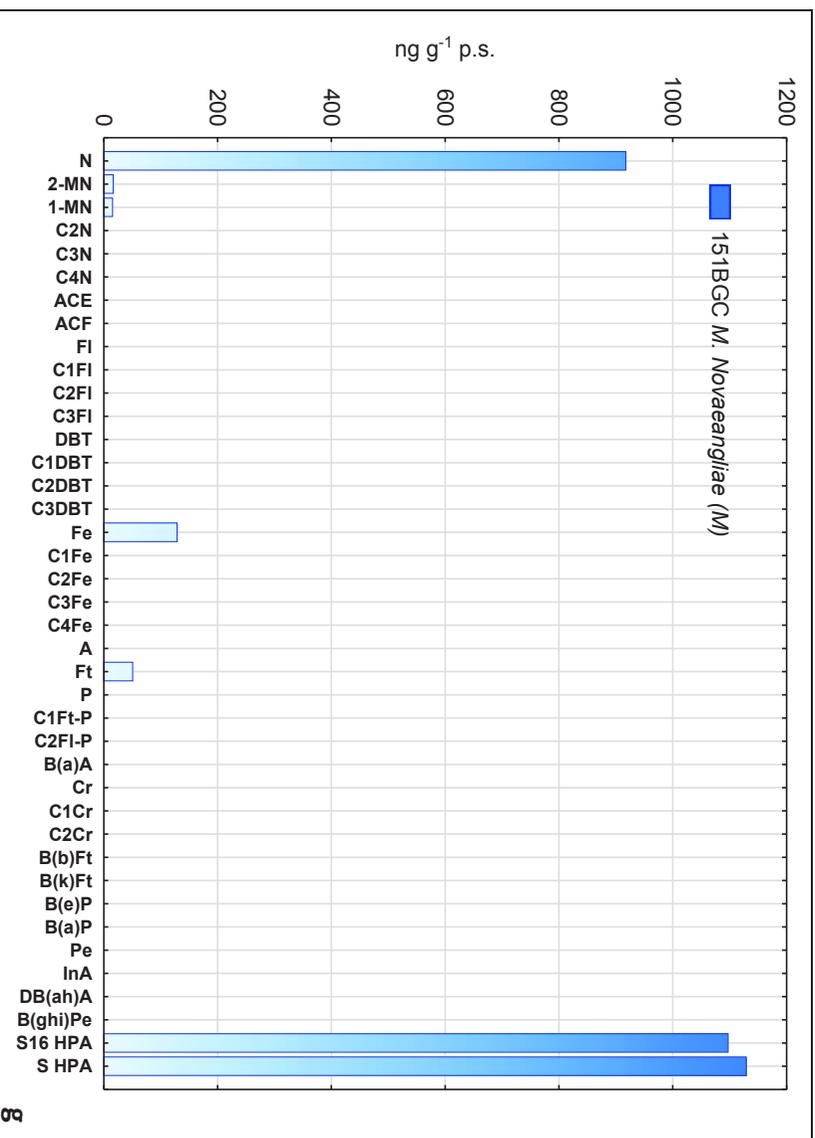
Face à massa reduzida de amostra, os tecidos foram picotados com tesoura, seguindo-se a extração em solvente em Soxhlet, redução do extrato em evaporador rotativo e a purificação dos extratos em colunas abertas e em cromatógrafo líquido de alta eficiência. O controle de qualidade incluiu o uso de padrões deuterados, curva de calibração, análise de brancos e brancos fortificados, análise de material de referência (NIST- SEM 2974a). Os limites de detecção (LD) variaram entre 0,1 e 3,8 ng g⁻¹ p.s.; os mais altos principalmente se referem aos naftalenos. Estes limites são equivalentes àqueles descritos na literatura.

Foram encontrados resultados maiores que LD e LQ (limites de detecção e quantificação) em 16 das 36 amostras analisadas. Estes estão resumidos nas Figuras 5 (gráficos a-j) e 6.









Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

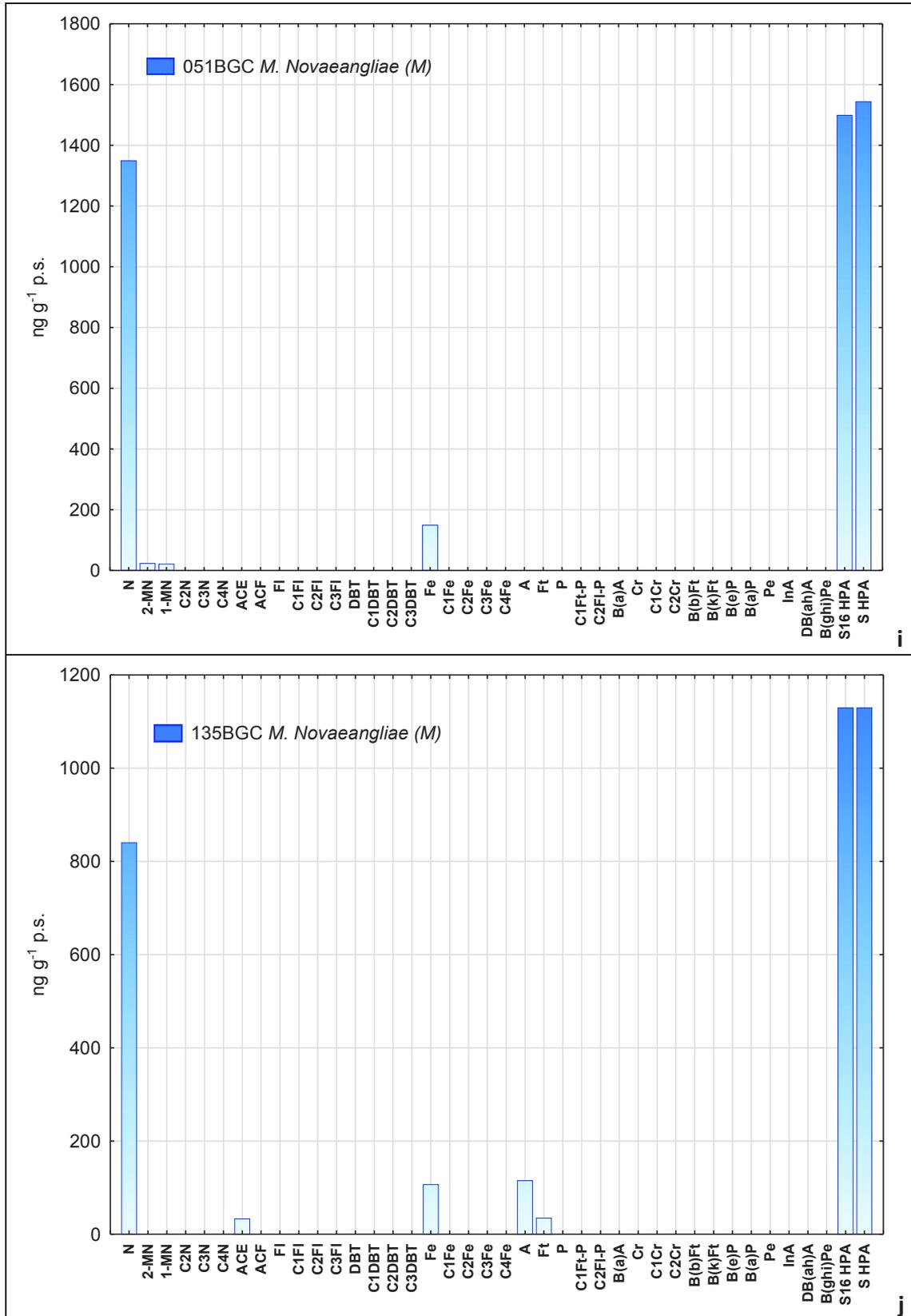


Figura 5. Gráficos das amostras nas quais houve quantificação de mais de um composto e em concentrações mais elevadas (10 amostras identificadas nos gráficos a-j), segundo informado pelos autores das análises.

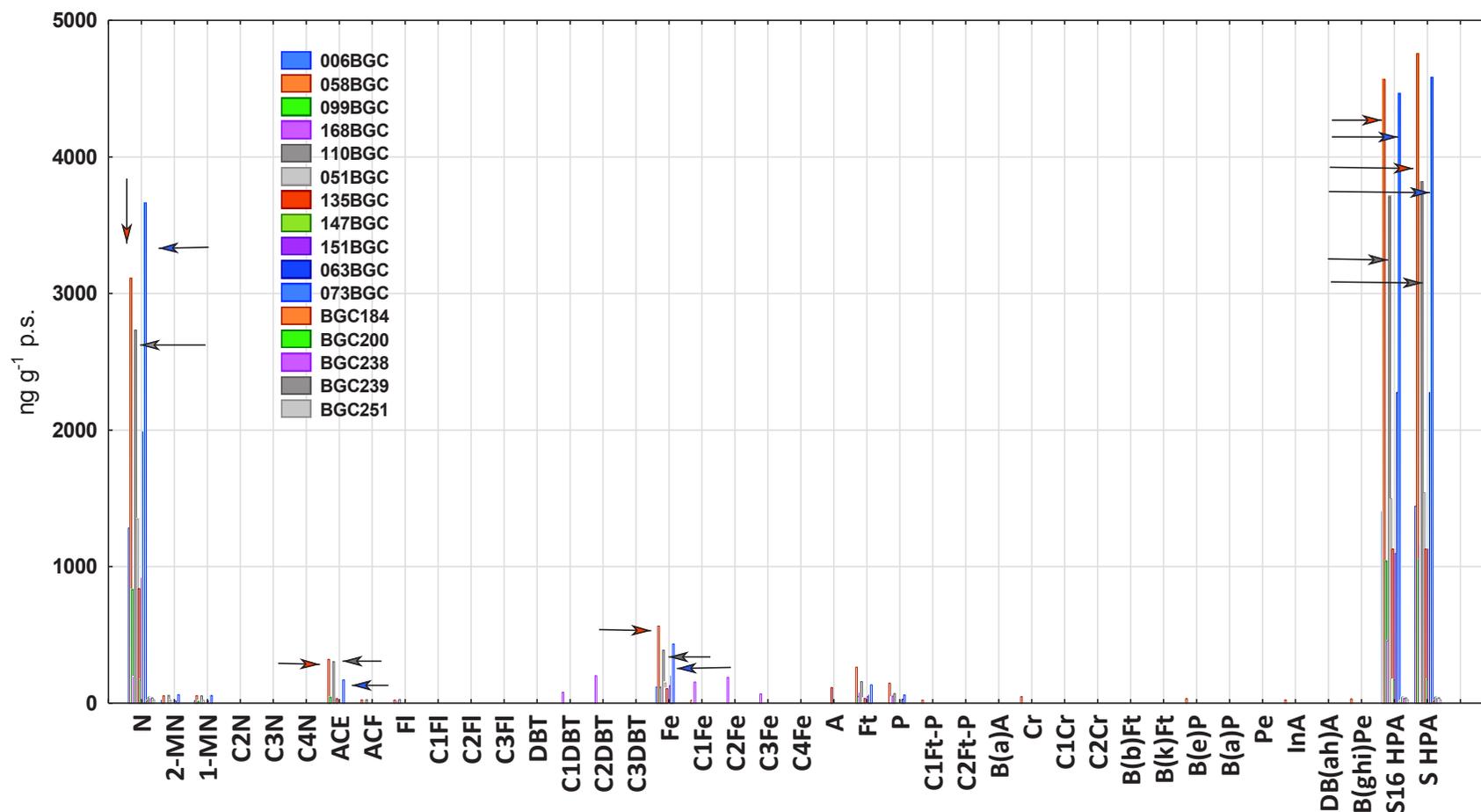


Figura 6. Conjunto geral das 16 amostras nas quais as concentrações foram superiores ao LD. Os gráficos incluem o somatório dos 16 HPAs e dos 39 HPAs (Total HPAs) objeto do estudo que se deu em espécies diferentes de cetáceos e de diferentes localidades. As setas em cor laranja, cinza e azul, indicam as barras de concentração dos compostos nas amostras 058BCG, 110BCG e 073BCG, respectivamente.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

A presença predominante de naftaleno é a feição mais evidente, como se verifica na Figura 6. Os somatórios mais elevados das concentrações encontram-se na amostra 058BGC (*T.truncatus*, fêmea), 16 HPAs = 4568,0 ng g⁻¹p.s. e Total HPAs = 4757,6 ng g⁻¹ p.s., seguida da amostra 073BGC (*B. borealis*, macho), 16HPAs= 4464,1 ng g⁻¹ p.s. e Total HPAs = 4584,2 ng g⁻¹ p.s. e da 110BGC (*S. brandanensis*, macho), 16 HPAs = 3709,3 ng g⁻¹ p.s. e Total HPAs = 3821,2 ng g⁻¹ p.s. Estas concentrações são menores ou da mesma ordem de grandeza daquelas reportadas em trabalhos publicados, alguns dos quais citados acima. A predominância do naftaleno também é frequentemente relatada na literatura.

Em relação à região de coleta dos animais, as amostras 006, 058 e 099, com concentrações de HPAs totais na faixa de cerca de 1400 a 4700 ng g⁻¹p.s, segundo as coordenadas, encontram-se na plataforma interna da Bacia de Santos, enquanto a amostra 110 teria sido coletada na região da Bacia de Campos. Estes patamares de concentração não são diferentes dos encontrados em amostras coletadas em outras estações, conforme mostram os gráficos da Figura 6.

A amostra 168BGC difere das demais por apresentar concentrações de dibenzotiofenos e fenantrenos alquilados que superam, no total, o naftaleno. A grande diferença entre a concentração dos 16HPAs e do Total HPAs demonstra a importância de alquilados nesta amostra. Esta feição e a predominância em C2 pode indicar que o animal esteve em contato com resíduos de óleo. Porém, dado o número limitado de compostos presentes em concentrações quantificáveis, não é possível reconhecer exatamente a origem do material. Além do mais, como já salientado, a acumulação e excreção alteram o padrão de distribuição dos HPAs originalmente presentes na água.

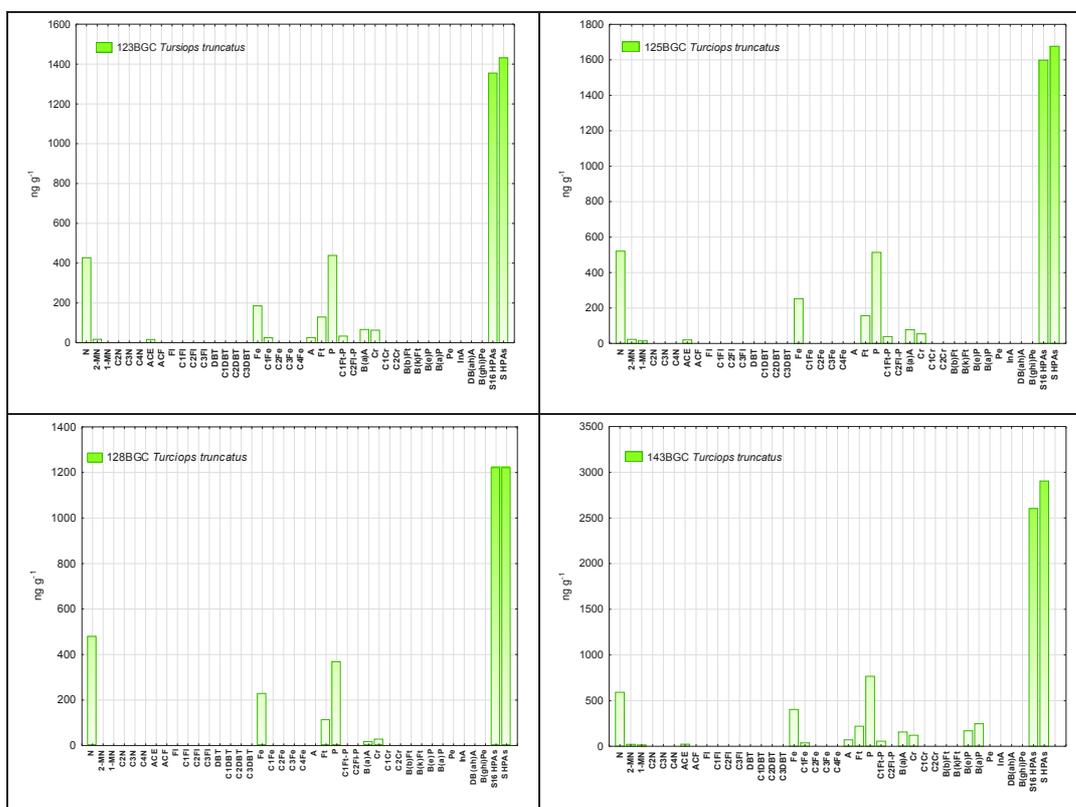
Uma vez que os LD reportados no projeto e a massa utilizada (0,25 g p.u.) são similares àqueles citados por outros autores na literatura (entre 0,03 e 0,31 g, por exemplo, Garcia-Alvarez et al, 2014 e Marsili et al., 2001), pode-se concluir que há baixa contaminação relativa dos animais observados até o momento.

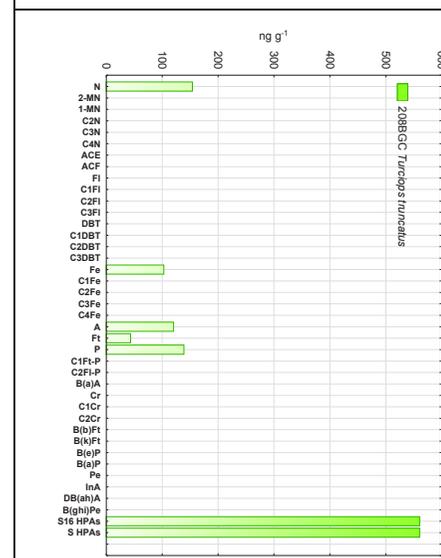
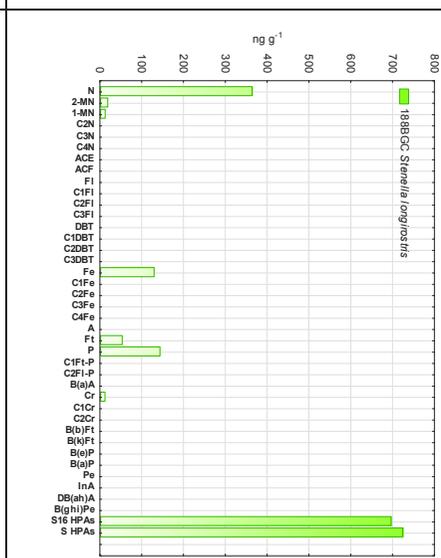
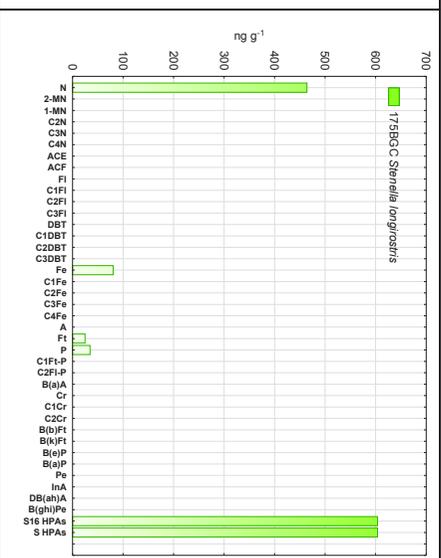
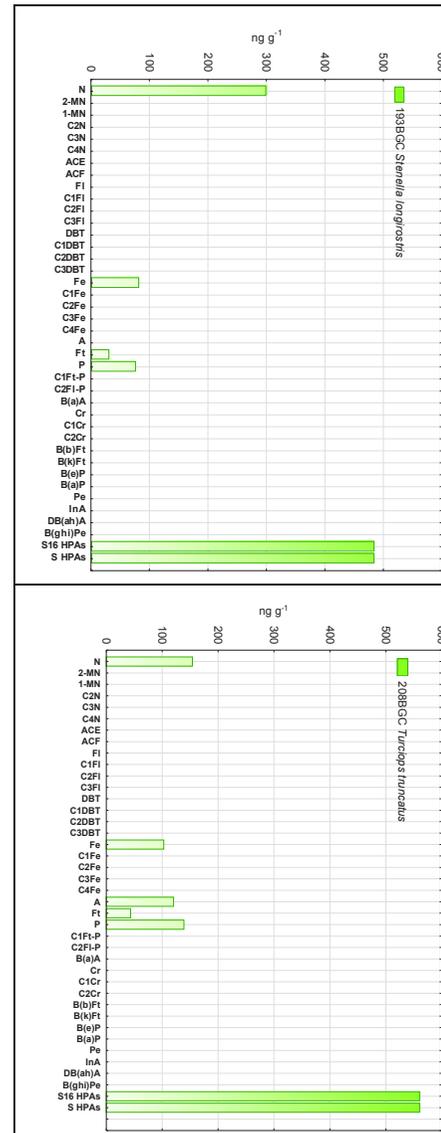
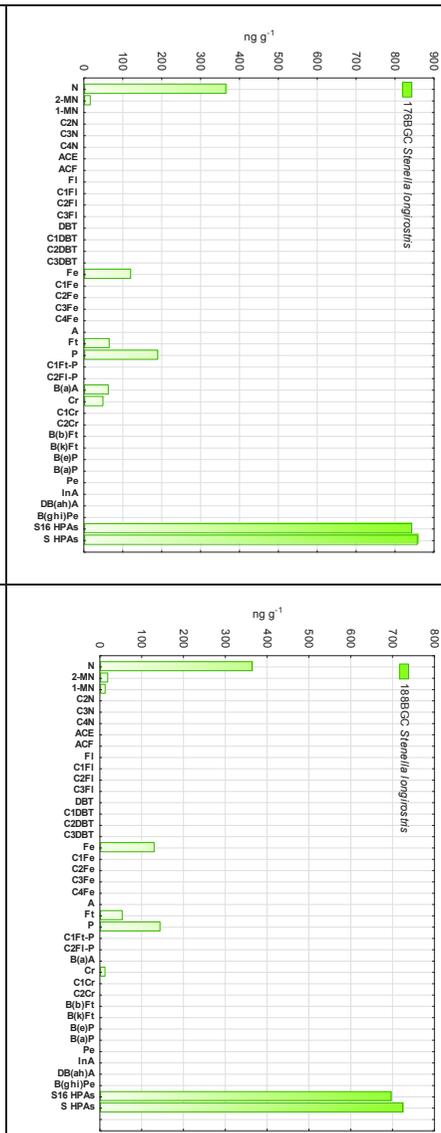
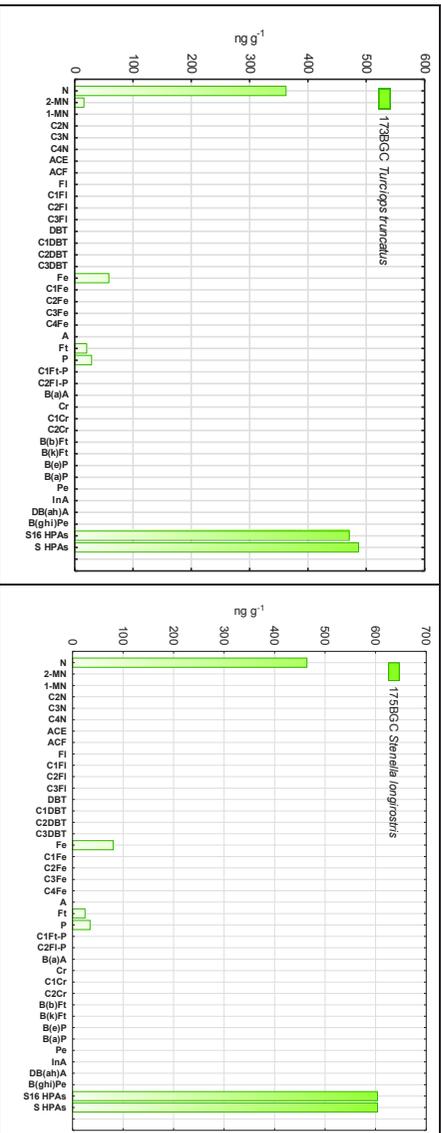
Um segundo lote de amostras (32 amostras) foi analisado em condições diferentes daquelas acima referidas, em função da disponibilidade de massa

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

menor de amostra. Foi utilizada uma massa de amostra 2,5 vezes menor, ou seja de 0,10 g, mas o extrato sofreu uma redução à 0,25 mL, ou seja, 4 vezes mais concentrado do que as amostras anteriores. Esta maior redução do volume do extrato final, mesmo com a massa menor, levou o LD e LQ para um patamar, segundo os responsáveis pela determinação analítica, 1,6 vezes inferior àqueles reportados anteriormente (entre 1,9 ng g⁻¹ p.s. para naftaleno e 0,1 ng g⁻¹ p.s. para os de maior massa molecular). Para os compostos de maior massa molecular, porém, não houve ganhos significativos. A presença de naftaleno em todas as amostras é uma garantia de que a redução do extrato a volume inferior a 1 mL (utilizado na maioria dos estudos) não teria resultado em perdas significativas dos analitos mais voláteis.

Na Figura 7 são mostradas as tipologias dos HPA's quantificados nas amostras que apresentam concentrações acima dos limites de quantificação.





Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

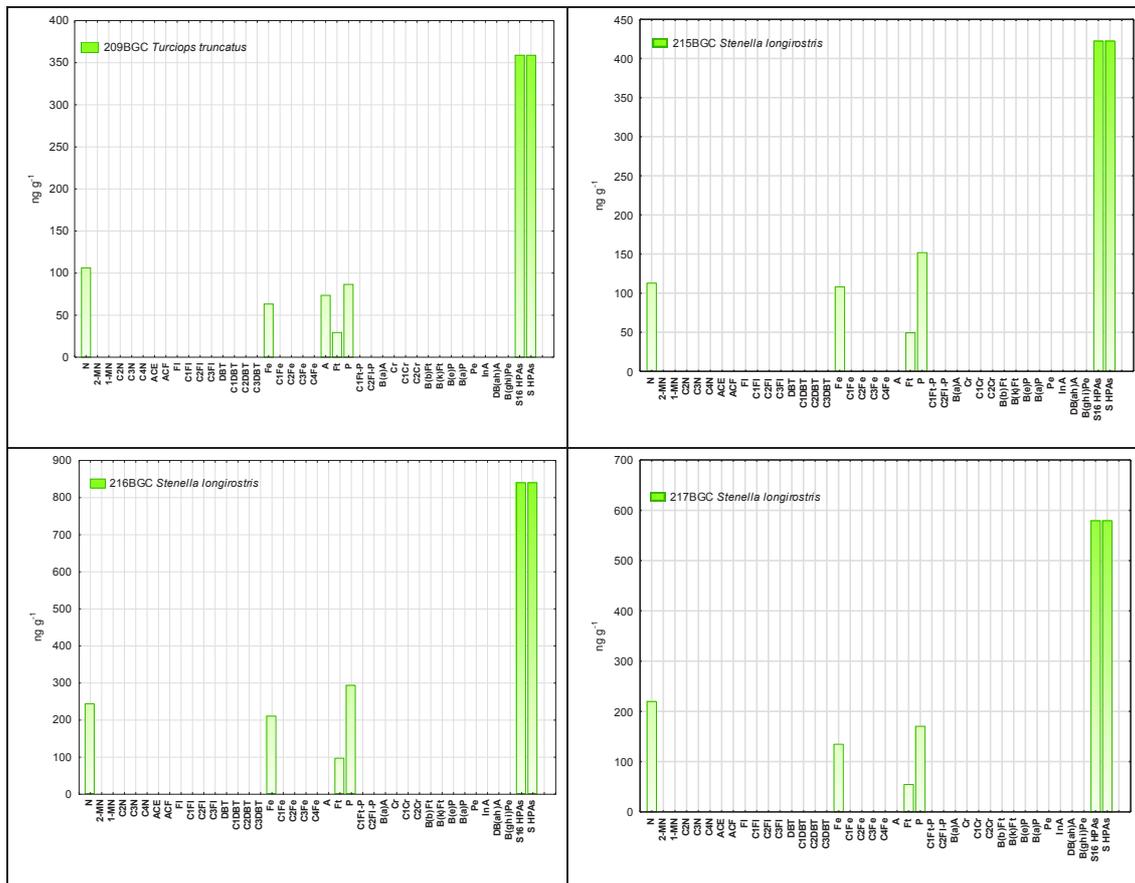


Figura 7: Tipologia dos HPAs nas amostras que apresentaram concentrações mais elevadas.

As concentrações totais de HPAs variaram entre $42,5 \text{ ng g}^{-1}$ (amostra 001) e $2904,1 \text{ ng g}^{-1}$ (amostra 143). Diferentemente das amostras do primeiro lote, encontram-se aqui HPAs de massa molecular mais elevada do que o antraceno. Naftaleno é ubíquo, mas nenhuma das amostras apresentou uma série alquilada com características petrogênicas (distribuição dos homólogos em formato de sino), há apenas em algumas o C1N e C1Fe. A amostra 143 apresenta concentrações significativas de B(a)Pi (247 ng g^{-1}). As tipologias aqui encontradas assemelham-se de forma mais clara ao esperado para resíduos de processos de combustão incompleta do que aquelas do primeiro lote, entre outras feições, pela ausência de séries alquiladas, as quais permitiriam avaliar melhor a questão de origem petrogênica ou pirolítica.

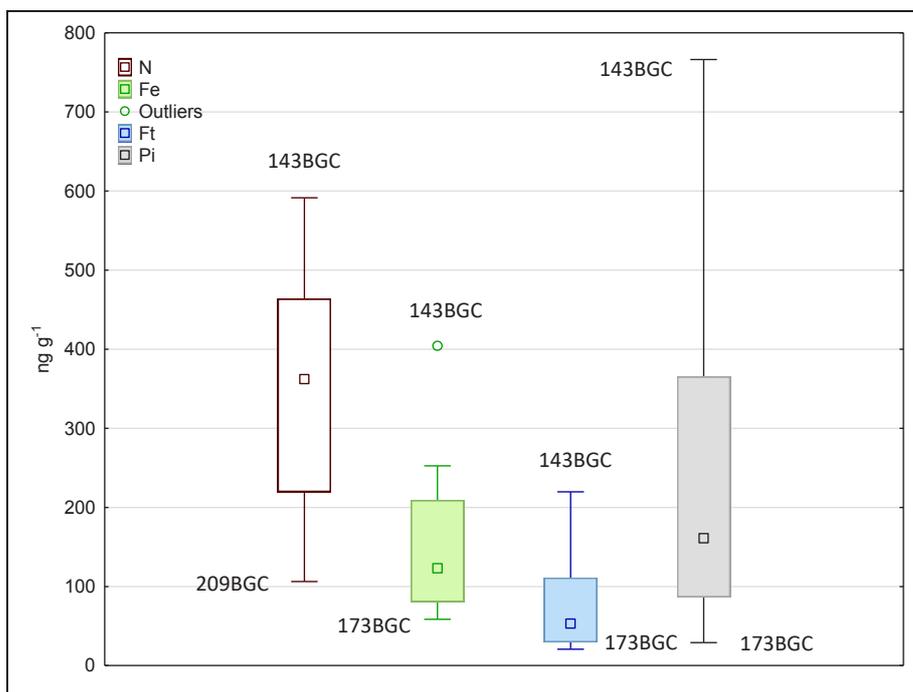


Figura 8: Box-plot representando a mediana, máximos e mínimos das concentrações dos compostos mais relevantes encontrados nas amostras elencadas na Figura 6 (BGC: 123, 125, 128, 143, 173, 175, 176, 188, 193, 208, 209, 215, 216, 217).

Como mostra a Figura 8, as maiores concentrações de todos os compostos mais frequentemente encontrados nas amostras da Figura 7 estão na amostra 143 (*Turciops truncatus*; Lat -22,81966 – Lon -41,83288), proveniente das proximidades da Baía de Campos, enquanto os mínimos são mais frequentes na amostra 173 (*Turciopstruncatus*; Lat -24,45574 – Lon -44,10591) obtida na área da Baía de Santos.

A Figura 9 resume o conjunto de dados obtidos para as amostras do segundo lote. Nota-se que, apesar do naftaleno estar presente em todas as amostras (média 194 +/- 169 ng g⁻¹), a média das concentrações acima do LD é muito inferior àquela encontrada para o primeiro lote (1078 +/- 1165 ng g⁻¹), que apresentou várias amostras com concentração de N abaixo do LD, mas alguns picos de concentração mais significativos.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

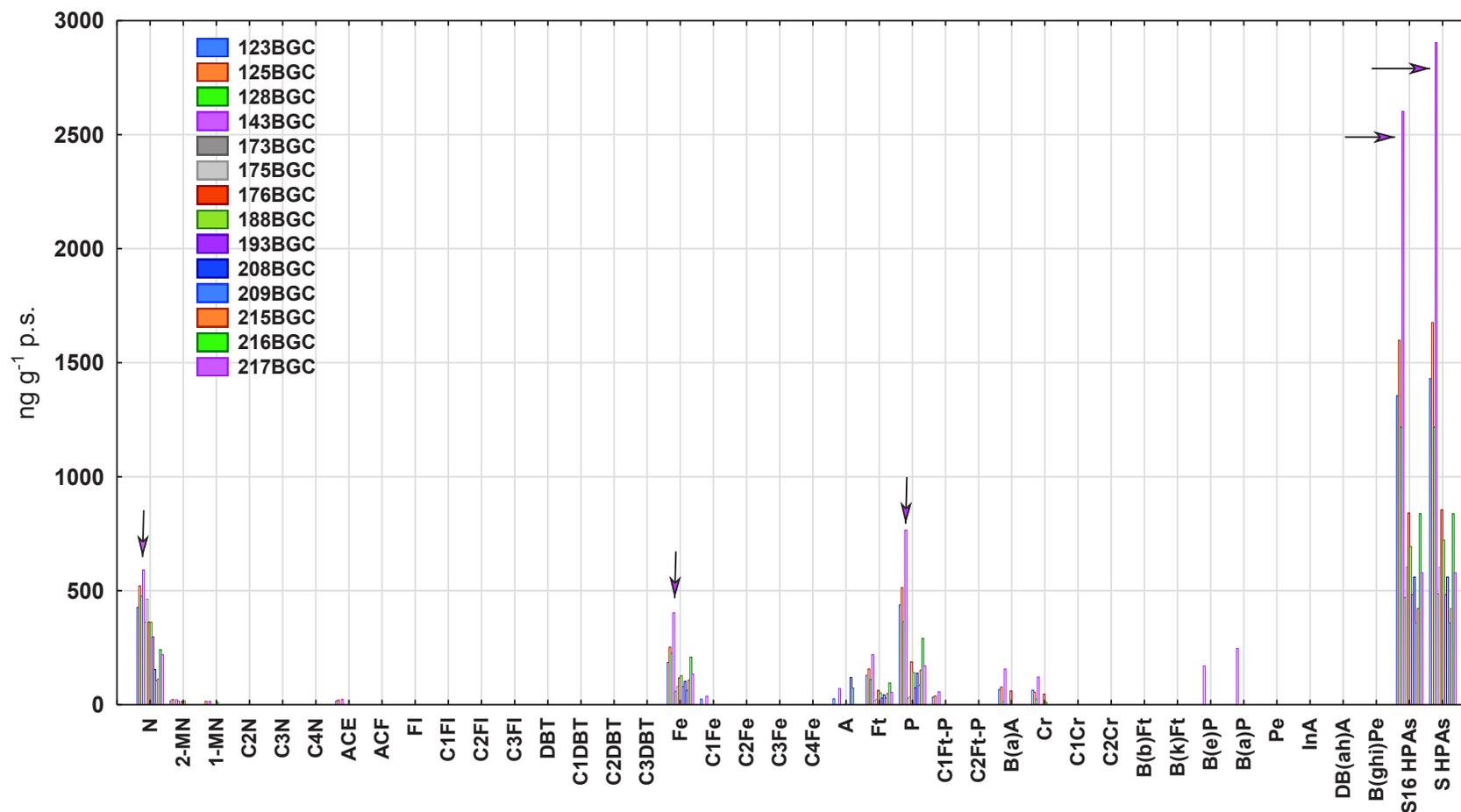


Figura 9. Conjunto geral das 14 amostras do segundo lote nas quais as concentrações foram superiores ao LD. Os gráficos incluem o somatório dos 16 HPAs e dos 39 HPAs (Total HPAs) objeto do estudo que se deu em espécies diferentes de cetáceos e de diferentes localidades. As setas indicam as barras relativas à concentração dos compostos na amostra 143BGC.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Recomendações

No que tange às condições das análises químicas, observa-se a aplicação de princípios que garantem a qualidade dos dados obtidos. Os limites de detecção e quantificação são adequados para indicação de possível exposição a níveis de HPAs que representem risco à biota. Deve-se levar em conta que não se tem uma informação das concentrações médias, obtidas após observações em várias ocasiões ao longo dos anos, nos substratos onde habitam e se alimentam os animais objeto do projeto. Porém, nos trabalhos publicados sobre a presença e natureza dos HPAs na Bacia de Campos (Falcão et al, 2017) os autores, que analisaram amostras coletadas em duas ocasiões distintas, relatam concentrações abaixo daquelas consideradas potencialmente danosas à biota (Buchman, 2008), tanto nos sedimentos como nas águas superficiais.

Caso seja desejável o incremento da detecção, deve ser averiguada a possibilidade de se trabalhar com massas maiores compostas a partir de um “pool” de amostras de animais da mesma espécie e mesmo sexo, e que sabidamente sejam residentes na mesma região amostrada, por exemplo integrantes do mesmo grupo amostrado. Esta possibilidade deve ser averiguada em relação à sua viabilidade juntamente às equipes executoras dos trabalhos e o órgão ambiental. Neste caso, é também maior a garantia de homogeneidade das amostras pois passa a ser possível o uso de Ultra turax.

Bibliografia

Aguilar, A., Borrell, A., 1994. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci. Total Environ.* 154, 237-247.

Andriolo, A.; Zerbini, A.N. Migração de baleias-jubarte: o que falta conhecer? *Revista de Etologia*, v. 9, p. 31-33. 2010



Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

ATSDR, 2017. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority list of hazardous substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>.

Baird, W.M., Ralston, S.L., 1997. In: Bowden, G.T., Fisher, S.M. (eds.), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, Oxford, UK, pp. 171–200.

Balmer, B., Schwacke, L., Wells, R., George, C., Hoguet, J., Kucklick, J., Lane, S., Martinez, A., McLellan, W., Rosel, P., Rowles, T., Sparks, K., Speakman, T., Zolman, E., Pabst, D. 2011. Relationship between persistent organic pollutants (POPs) and ranging patterns in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal Georgia, USA. *Sci. Total Environ.* 409, 2094–2101.

Bearzi, G.; Bjørge, A.; Forney, K.A.; Hammond, P.S.; Karkzmarski, L.; Kasuya, T.; Perrin, W.F.; Scott, M.D.; Wang, J.Y.; Wells, R.S.; Wilson, B. *Stenella longirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e.T20733A17837287. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T20733A17837287.en>. Acesso em: 11 de dezembro de 2017.

Ben-David, M., Kondratyuk, T., Woodin, B., Snyder, P., Stegeman, J. 2001. Induction of cytochrome P450 1A1 expression in captive river otters fed Prudhoe Bay crude oil: evaluation by immunohistochemistry and quantitative RT-PCR. *Biomarkers* 6, 218-235.

Buchman, M.F. 2008. NOAA Screening Quick Reference. Coastal Protection and Restoration Division. Seattle: National Oceanic and Atmospheric Administration.

Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R., Parra, L., Pfohl-Leskowicz, A., Raoux, C., Galgani, F. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 125-141.

Cagnazzi, Fossi, D., Parra, G., Harrison, P., Maltese, S., Coppola, D. et al. 2013. Anthropogenic contaminants in Indo-Pacific humpback and Australian Snubfin dolphins from the central and southern great barrier reef. *Environ. Pollut.* 182, 490-494.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Camacho, M., Boada, L., Oros, J., Calabuig, P., Zumbado, M., Luzardo, O. 2012. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Mar. Poll. Bull. 64, 1974-1980.

Carvan, M.J. III, 1993. In vitro toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and halogenated aromatic hydrocarbons to cetacean cells and tissues. United States (WEB).

De Guise, S., Levin, M., Gebhard, E., Jasperse, L., Hart, L.B., Smith, C.R., Venn-Watson, S., Townsend, F., Wells, R.S., Balmer, B. 2017. Changes in immune functions in bottlenose dolphins in the northern Gulf of Mexico associated with the Deepwater Horizon oil spill. Endanger. Species Res. 33, 291–303.

Dipple, A., Pigott, M., Agarwal, S., Yagi, H., Sayer, J., Jerina, D. 1987. Optically active benzo[c]phenanthrene diol-epoxides bind extensively to adenine in DNA. Nature 327, 535–536.

dolphins (*Sousa sahulensis*) inhabiting an urbanised embayment. Chemosphere 151, 253-262.

epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. Mutation Res. 544, 397–402.

Ewa, B., Danuta, M. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. J Appl Genet. 58, 321–330

Fair, P., Adams, J., Mitchum, G., Hulsey, T., Reif, J., Houde, M., Muir, D., Wirth, E., Wetzel, D., Zolman, E., McFee, W., Bossart, G. 2010. Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: Concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. Sci. Total Environ. 408, 1577–1597.

Falcão, A.P., Wagener, A. L. R., Carreira, R. S. 2017. Química Ambiental, Caracterização Ambiental Regional da Bacia de Campos, Atlântico Sudoeste. 1ª. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, v. 1. 312p.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Farmer, P., Singh, R., Kaur, B., Sram, R., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A., Cebulka-Wasilewska, A. 2003. Molecular

Formigaro C., Henriquez-Hernandez L., Zaccaroni A., Garcia-Hartmann M., Camacho M., Boada L., et al. 2014. Assessment of current dietary intake of organochlorine contaminant sand polycyclic aromatic hydrocarbons in killer whales (*Orcinus orca*) through direct determination in a group of whales in captivity. *Sci. Total Environ.* 472, 1044–1051.

Fossi, M. C., Marsili, L., Leonzio, C., G., Zanardelli, M., Focardi, S. 1992. The use of non-destructive biomarker in Mediterranean cetaceans: Preliminary data on MFO activity in skin biopsy. *Mar. Poll. Bull.* 24, 459-461.

Frouin, H., Fortier, M., Fournier, M., 2010. Toxic effects of various pollutants in 11B7501 lymphoma B cell line from harbour seal (*Phocavitulina*). *Toxicology.* 270, 66-76.

Gadagbui, B., Goksoyr, A. 1996. CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta River (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clariasanguillaris*). *Biomarkers.* 1, 252–261.

García-Alvarez, Martín, V., Fernández, A., Almunia, J., Xuriacha, A., Arbelo, M., Tejedor, M., Boada, L., Zumbadod, M, Luzardo, O. 2014b. Levels and profiles of POPs (organochlorine pesticides, PCBs, and PAHs) in free-ranging common bottlenose dolphins of the Canary Islands, Spain. *Sci. Total Environ.* 493, 22–31.

García-Álvarez, N., Boada, L., Fernández A., Zumbado, M., Arbelo, M., Sierra, E., Xuriach, A., Almunia, J., Camacho, M., Luzardo, L., 2014a. Assessment of the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Eastern Atlantic Ocean. *Mar. Environ. Res.*, 100, 48-56.

Gelboin, H.V. 1980. Benzo[a]pyrene metabolic activation and carcinogenicity: role and regulation of mixed function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107– 1166.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Goksoyr, A., Forlin, L. 1992. The cytochrome-P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat.Toxicol.* 22, 287–311.

Hammond, P.S.; Bearzi, G.; Bjørge, A.; Forney, K.A.; Karkzmarski, L.; Kasuya, T.; Perrin, W.F.; Scott, M.D.; Wang, J.Y.; Wells, R.S.; Wilson, B. 2012. *Stenella frontalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: e.T20732A17832795.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T20732A17832795.en>. Acesso em: 11 de dezembro de 2017.

Harvey, R.G.1991. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 11 –87.

Hecht, S., Melikian, A., Amin, S., 1986. Methylchrysene as probes for the mechanism of metabolic activation carcinogenic methylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Acc. Chem. Res.* 19, 174– 180.

Hoffman, D., Rattner, B., Burton, G., Cairns, J. 2003. Handbook of Ecotoxicology, second edition, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp. 1315.

Jepson, P., Bennett, P., Deaville, R., Allchin, C., Law, R. 2005. Relationships between PCBs and health status in UK-stranded harbour porpoises (*Phocoenaphocoena*). *Environ.Toxicol. Chem.* 24, 238–48.

Jimenez, B., Stegeman, J.1990. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. *Ann. Fish. Soe. Symp.* 8, 67-79.

Kellar, N.M., Speakman, T.R., Smith, C.R., Lane, S.M., Balmer, B.C., Trego, M.L., Catelani, K.N., Robbins, M.N., Allen, C.D., Wells, R.S. 2017. Low reproductive success rates of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the northern Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon disaster (2010–2015). *Endanger. Species Res.* 33, 143–158.

Kucklick, J., Schwacke, L., Wells, R., Hohn, A., Guichard, A., Yordy, J., Hansen, L., Zolman, E., Wilson, R., Litz, J., Nowacek, D., Rowles, T., Pugh, R., Balmer, B., Sinclair, C., Rosel, P. 2011. Bottlenose dolphins as indicators of persistent organic pollutants in the western North Atlantic Ocean and northern Gulf of Mexico. *Environ. Sci.Technol.* 45 (10), 4270–7.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Kuehl, D.W., Haebler R., Potter C. 1991. Chemical residues in dolphins from the United States Atlantic coast including Atlantic bottlenose obtained during the 1987/88 mass mortality. *Chemosphere*, 22, 1071–84.

Leung, C., Jefferson, T., Hung, S., Zheng, Yeung, L., Richardson, B., Lam, P. 2005. Petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in tissues of Indo-Pacific humpback dolphins from south China waters. *Mar. Poll. Bull.* 50, 1713–1744.

Levin, W., Thakker, D., Wood, A., Chang, R., Lehr, R., Jerina, D., Conney, A. 1978. Evidence that benz[a]anthracene-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide is an ultimate carcinogen on mouse skin. *Cancer Res.* 38, 1705–1710.

Lopes, X.M.; Santos, M.C.O.; Silva, E.; Bassoi, M.; Santos, R.A. Feeding habits of the atlantic spotted dolphin, *Stenella frontalis*, in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 60, p. 189-198. 2012.

Marsili, L. Caruso, A., Fossi, M.C., Zanardelli, M., Politi, E., Focardi, S. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere* 44, 147-154.

Martineau, D., Lemberger, A., Dallaire, P., Labelle, T., Lipscomb, P., Midaelian, I. 2002. Cancer in wildlife, a case study: Beluga from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Environ. Health Perspect.* 110, 285–292.

Massone, C., Wagener, A., Abreu, H., Gioda, A. 2015. Hydrocarbon concentration and source appraisal in atmospheric particulate matter (PM_{2.5}) of an urban tropical area. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14767–14780

Matkin, C.O., Saulitis, E.L., Ellis, G.M., Olesiuk, P., Rice, S.D. 2008. Ongoing population level impacts on killer whales *Orcinus orca* following the 'Exxon Valdez' oil spill in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 356, 269–281.

Mauad, C., Wagener, A., Massone, C., Aniceto, N., Lazzari, L., Carreira, R., Farias, C. 2015. Urban rivers as conveyors of hydrocarbons to sediments of estuarine areas: source characterization, flow rates and mass accumulation. *Sci. Total Environ.* 506-507, 656–666.



Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Mordquist, M., Thakker, D., Vyas, K., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D., Thomas, D., Conney, A., Jerina, D. 1981. Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol-epoxide by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.* 19, 168–178.

Morey, J.; Neely, M.G.; Lunardi, D.; Anderson, P.E.; Schwacke, L.H.; Campbell, M.; Van Dolah, F. RNA-Seq analysis of seasonal and individual variation in blood transcriptomes of healthy managed bottlenose dolphins. *BMC Genomics*, v. 17. 2016.

NRCC, 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on aquatic biota. National Research Council Canada, 18981, 1-209.

Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Otto, D., Moon, T. 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch. Environ. Con. Tox.* 31, 141–147.

Panti, C., Spinsanti G., Marsili, L., Casini, S., Frati, F., Fossi, M.C. 2011. Ecotoxicological diagnosis of striped dolphin (*Stenellacoeruleoalba*) from the Mediterranean basin by skin biopsy and gene expression approach. *Ecotoxicology* 20, 1791–1800

Petrobras. 2º Relatório Anual Do Projeto De Monitoramento De Cetáceos Na Bacia De Santos - Pmc-Bs. Volume único. 2017.

Petrobras. Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos PMC-BS, 2015.

Ralston, S., Lau, H., Seidel, A., Luch, A., Baird, W. 1995. Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene to (-)-anti(11R,12S,13S,14R)- and (+)-syn(11S,12R,13S,14R)-11,12diol-13,14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 16, 1907– 2899.

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Ralston, S., Lau, H., Seidel, A., Luch, A., Platt, K., Baird, W. 1994. The potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene is metabolically activated to fjord-region 11,12-diol 13,14-epoxides in human mammary carcinoma MCF-7 cell cultures. *Cancer Res.* 54, 887–890.

Reilly, S.B.; Bannister, J.L.; Best, P.B.; Brown, M.; Brownell Jr., R.L.; Butterworth, D.S.; Clapham, P.J.; Cooke, J.; Donovan, G.P.; Urbán, J.; Zerbini, A.N. 2008a. *Balaenoptera borealis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T2475A9445100.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T2475A9445100.en>. Acesso em: 11 de dezembro de 2017.

Reilly, S.B.; Bannister, J.L.; Best, P.B.; Brown, M.; Brownell Jr., R.L.; Butterworth, D.S.; Clapham, P.J.; Cooke, J.; Donovan, G.P.; Urbán, J.; Zerbini, A.N. 2008b. *Megaptera novaeangliae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T13006A3405371.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T13006A3405371.en>. Acesso em: 11 de dezembro de 2017.

Schwacke, L., Smith, C., Townsend, F., Wells, R., Hart, L., Balmer, B., Collier, K., Guise, S., Fry, M., Guillette, L., Lamb, S., Lane, S., McFee, W., Place, N., Tumlin, M., Ylitalo, G., Zolman, E., Rowles, T. 2013. Health of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, Following the Deepwater Horizon oil spill. *Environ. Sci. Technol.* 48, 93–103.

Slaga, T., Gleason, G., DiGiovanni, J., Sukumaran, K., Harvey, R. 1979. Potent tumor initiating activity of the 3,4-dihydrodiol-7,12-dimethylbenz[a]anthracene in mouse skin. *Cancer Res.* 39, 1934–1936.

Stimmelmayer, R., Ylitalo, G.M., Sheffield, G., Beckmen, K.B., Burek-Huntington, K.A., Metcalf, V., Rowles, T. 2018. Oil fouling in three subsistence-harvested ringed (*Phocahispida*) and spotted seals (*Phocalargha*) from the Bering Strait region, Alaska: polycyclic aromatic hydrocarbon bile and tissue levels and pathological findings. *Mar. Pollut. Bull.* 130, 311–323

Swart, R., Ross, P., Vos, J., Osterhaus, A. 1996. Impaired immunity in harbour seals (*Phocavitulina*) exposed to bioaccumulation environmental

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

contaminants: review of a long term feeding study. *Environ. Health Perspect.* 104, 823–828.

Tanabe, S. 2002. Contamination and Toxic Effects of Persistent Endocrine Disrupters in Marine Mammals and Birds. *Mar. Poll. Bull.* 45, 69-77.

Van Dolah, F.M.; Neely, M.G.; McGeorge, L.E.; Balmer, B.C.; Yitalo, G.M.; Zolman, E.S.; Speakman, T.; Sinclair, C.; Kellar, N.M.; Rosel, P.E.; Mullin, K.D.; Schwacke, L.H. Seasonal variation in the skin transcriptome of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the northern Gulf of Mexico. *PlosOne*, v.10, n. 6, p. 1-21. 2015.

Venn-Watson, S., Colegrove, K.M., Litz, J., Kinsel, M., Terio, K., Saliki, J., Fire, S., Carmichael, R., Chevis, C., Hatchett, W., Pitchford, J., Tumlin, M., Field, C., Smith, S., Ewing, R., Fauquier, D., Lovewell, G., Whitehead, H., Rotstein, D., McFee, W., Fougères, E., Rowles, T. 2015. Adrenal gland and lung lesions in Gulf of Mexico common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found dead following the Deepwater Horizon oil spill. *Plos One* 10.

Wagener A, Hamacher, C., Farias, C., Godoy J., Scofield, A. 2010. Evaluation of tools to identify hydrocarbon sources in recent and historical sediments of a tropical bay. *Mar. Chem.* 121, 67–79.

Wagener, A., Meniconi, M., Hamacher, C., Farias, C., da Silva, G., Gabardo, I., Scofield, A. 2012. Hydrocarbons in sediments of a chronically contaminated bay: the challenge of source assignment. *Mar. Poll. Bull.* 64, 284–94.

Wang, Z., Fingas, M., Landriault, P., Sigouin, L., Feng, Y., Mullin, J. 1997. Using systematic and comparative analytical data to identify the source of an unknown oil on contaminated birds. *J. Chromatogr. A* .775, 251-265.

Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S. 1999. Oil spill identification. *J. Chromatogr. A*. 843, 369-411.

Weijls, L., Vijayasathy, S., Villa, C.A., Neugebauer, F., Meager, J., Gaus, C. 2016. Screening of organic and metal contaminants in Australian humpback
Wetzel, D., Pulster, E., Reynolds, J., Morales, B., Gelsleichter, J., Oliaei, F., et al. 2008. Organic contaminants in West Indian manatees from Florida and



Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Mexico: a pilot study, Mote Marine Laboratory Technical Report No. 1263, p. 1-33.

Whyte, J., Jung, R., Schmitt, C., Tillitt, D. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347-570.

Xue, W., Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbon sand DNA damage: a review. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 206, 73– 93.

Yordy, J., Wells, R., Balmer, B., Schwacke, L., Rowles, T., Kucklick, J. 2010. Life history as a source of variation for persistent organic pollutant (POP) patterns in a community of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to Sarasota Bay, FL. *Sci. Total Environ.* 408, 2163-2172.

Yunker, M., MacDonald, R., Vingarzan, R., Mitchell, R., Goyette, D., Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser River Basin: a Critical Appraisal of PAH Ratios as Indicators of PAH Source and Composition. *Org. Geochem.* 33, 489-515.



Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

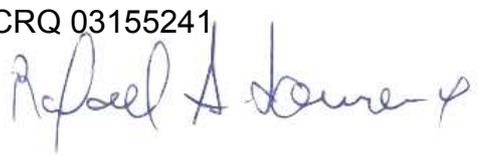
Anexo 1: Laudos Emitidos pelo IO/USP



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	346/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	006BGC / 25076
Data de Coleta	25/02/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	006BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	601,0
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	9,8
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	9,3
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	55,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			656,6
Σ HPA			675,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			73
Umidade (%)			53,2
Lipídios (%)			13,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

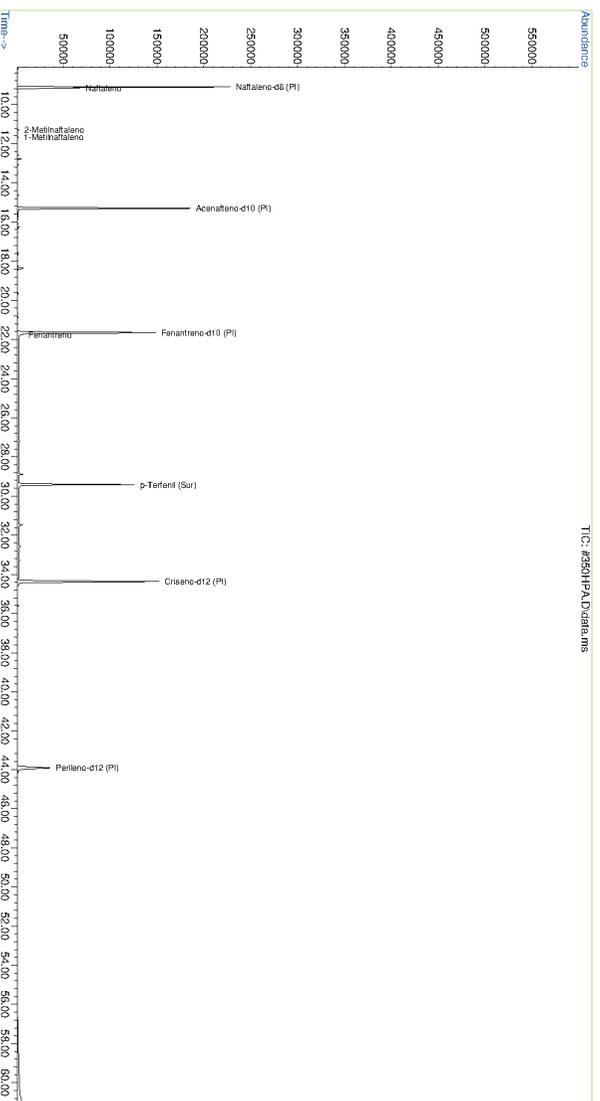
Biópsia (SiSPMC) /Tecido	006BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,3	19,2	1283,5
2-Metilnaftaleno	1,3	19,2	20,8
1-Metilnaftaleno	1,3	19,2	19,8
C2-Naftaleno	1,3	19,2	<1,3
C3-Naftaleno	1,3	19,2	<1,3
C4-Naftaleno	1,3	19,2	<1,3
Acenaftileno	0,3	19,2	<0,3
Acenafteno	0,3	19,2	<0,3
Fluoreno	0,1	19,2	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	19,2	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	19,2	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	19,2	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	19,2	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	19,2	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	19,2	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	19,2	<0,4
Fenantreno	0,6	19,2	118,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	19,2	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	19,2	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	19,2	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	19,2	<0,6
Antraceno	0,3	19,2	<0,3
Fluoranteno	0,4	19,2	<0,4
Pireno	0,3	19,2	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	19,2	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	19,2	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,6	19,2	<0,6
Criseno	0,6	19,2	<0,6
C1-Criseno	0,6	19,2	<0,6
C2-Criseno	0,6	19,2	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,4	19,2	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	19,2	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	19,2	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	19,2	<0,1
Perileno	0,1	19,2	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	19,2	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	19,2	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	19,2	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1402,2
Σ HPA			1442,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			73
Umidade (%)			53,2
Lipídios (%)			13,2

TCA = Amostra de Gordura

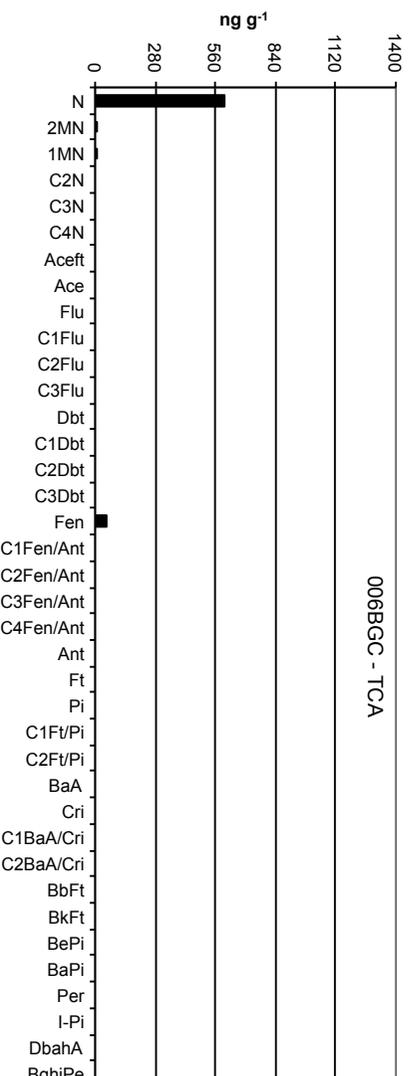
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

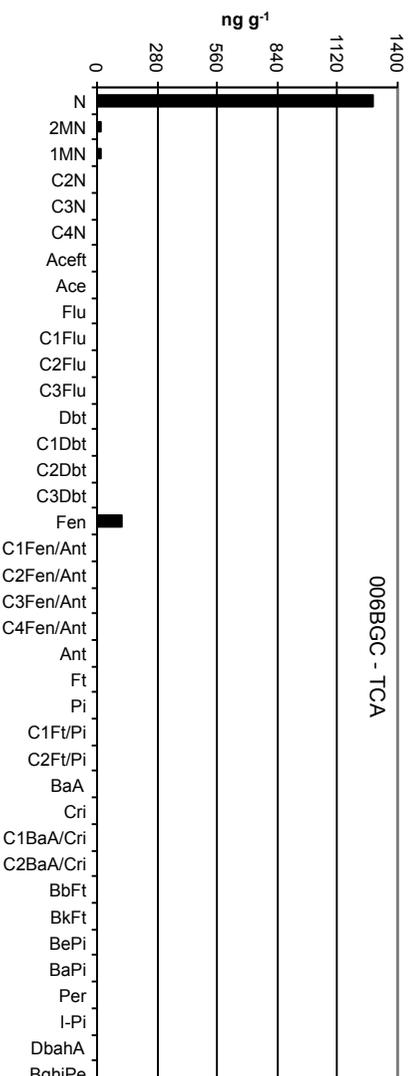
Amostra 006BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenaftileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

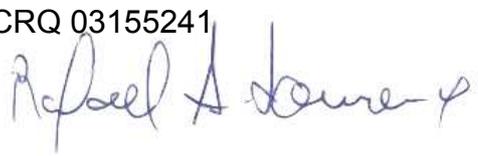
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	347/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	063BGC / 28389
Data de Coleta	24/08/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	063BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	836,72
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	84,68
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	25,48
Pireno	0,1	9,0	11,72
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			958,6
Σ HPA			958,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			60
Umidade (%)			57,9
Lipídios (%)			6,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

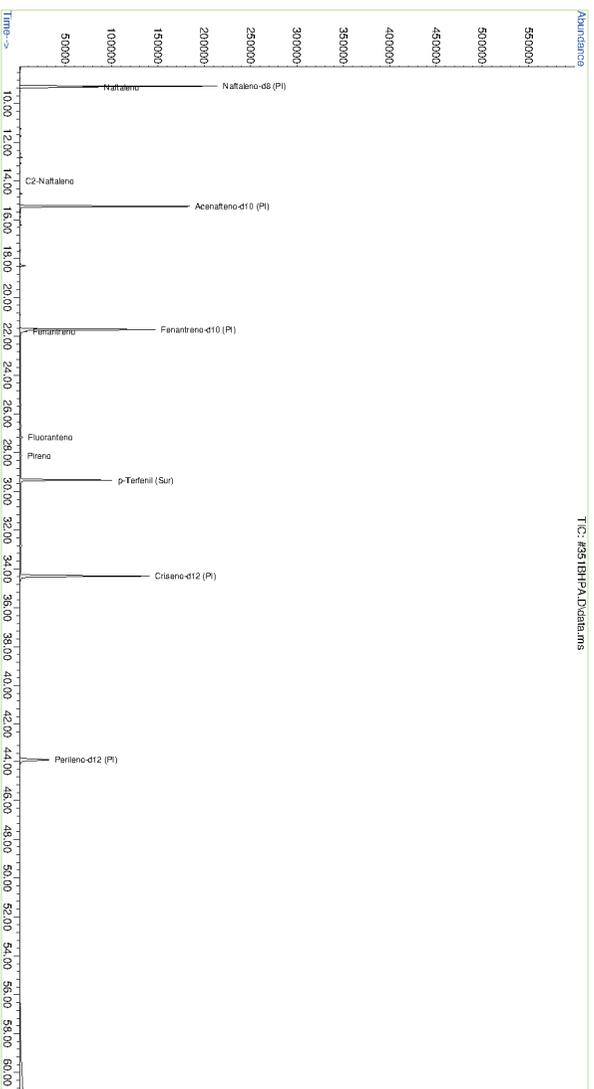
Biópsia (SiSPMC) /Tecido	063BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,4	21,4	1987,2
2-Metilnaftaleno	1,4	21,4	<1,4
1-Metilnaftaleno	1,4	21,4	<1,4
C2-Naftaleno	1,4	21,4	<1,4
C3-Naftaleno	1,4	21,4	<1,4
C4-Naftaleno	1,4	21,4	<1,4
Acenaftileno	0,3	21,4	<0,3
Acenafteno	0,3	21,4	<0,3
Fluoreno	0,1	21,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	21,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	21,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	21,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	21,4	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	21,4	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	21,4	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	21,4	<0,4
Fenantreno	0,7	21,4	201,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	21,4	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	21,4	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	21,4	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	21,4	<0,7
Antraceno	0,3	21,4	<0,3
Fluoranteno	0,4	21,4	60,5
Pireno	0,3	21,4	27,8
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	21,4	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	21,4	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	21,4	<0,7
Criseno	0,7	21,4	<0,7
C1-Criseno	0,7	21,4	<0,7
C2-Criseno	0,7	21,4	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	21,4	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	21,4	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	21,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	21,4	<0,1
Perileno	0,1	21,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	21,4	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	21,4	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	21,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			2276,7
Σ HPA			2276,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			60
Umidade (%)			57,9
Lipídios (%)			6,8

TCA = Amostra de Gordura

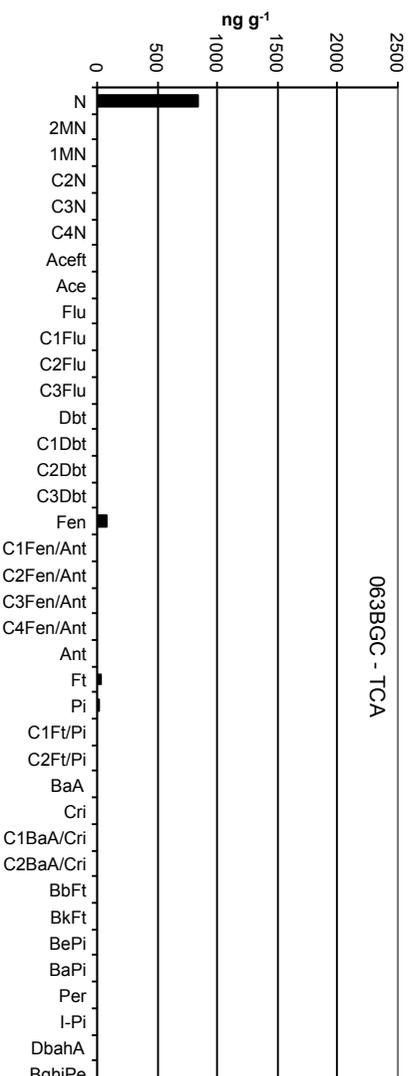
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

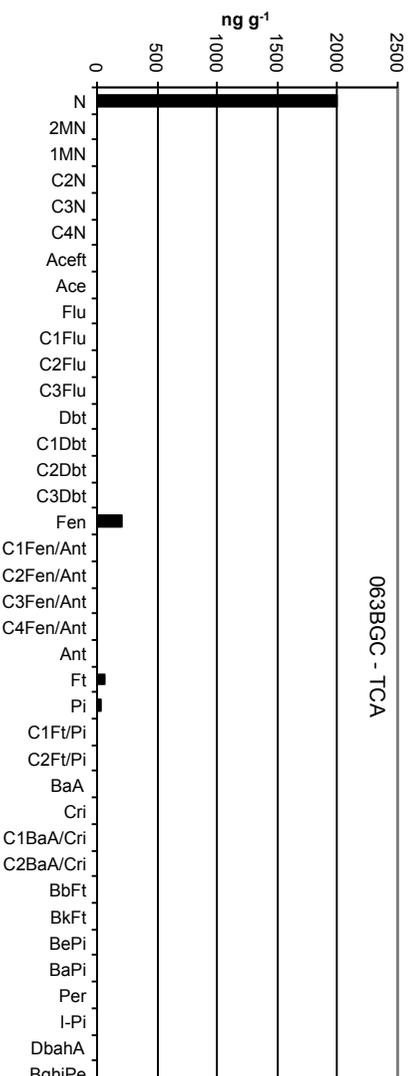
Amostra 063BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenaftileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

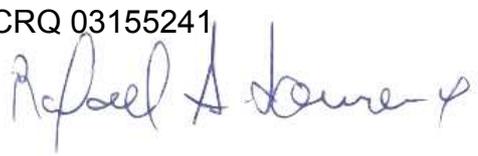
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	348/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	051BGC / 28247
Data de Coleta	10/08/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	051BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	682,7
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	11,8
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	10,8
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	75,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			758,2
Σ HPA			780,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			49,4
Lipídios (%)			31,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

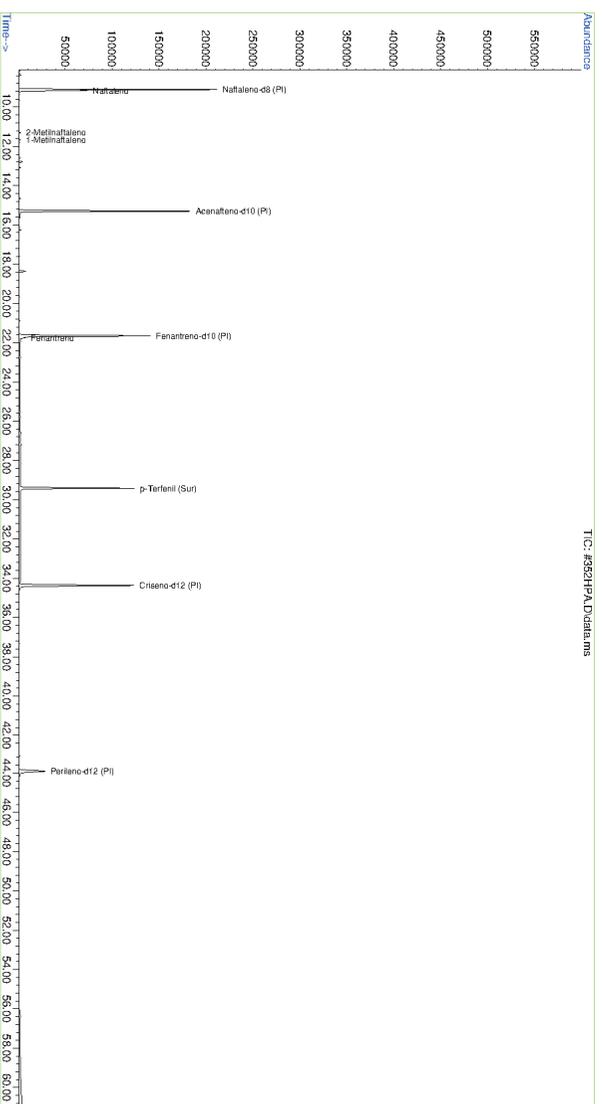
Biópsia (SiSPMC) /Tecido	051BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,2	17,8	1349,4
2-Metilnaftaleno	1,2	17,8	23,3
1-Metilnaftaleno	1,2	17,8	21,4
C2-Naftaleno	1,2	17,8	<1,2
C3-Naftaleno	1,2	17,8	<1,2
C4-Naftaleno	1,2	17,8	<1,2
Acenaftileno	0,2	17,8	<0,2
Acenafteno	0,2	17,8	<0,2
Fluoreno	0,1	17,8	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	17,8	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	17,8	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	17,8	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	17,8	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	17,8	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	17,8	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	17,8	<0,4
Fenantreno	0,6	17,8	149,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	17,8	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	17,8	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	17,8	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	17,8	<0,6
Antraceno	0,2	17,8	<0,2
Fluoranteno	0,4	17,8	<0,4
Pireno	0,2	17,8	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	17,8	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	17,8	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,6	17,8	<0,6
Criseno	0,6	17,8	<0,6
C1-Criseno	0,6	17,8	<0,6
C2-Criseno	0,6	17,8	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,4	17,8	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	17,8	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	17,8	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	17,8	<0,1
Perileno	0,1	17,8	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	17,8	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	17,8	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	17,8	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1498,6
Σ HPA			1543,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			49,4
Lipídios (%)			31,2

TCA = Amostra de Gordura

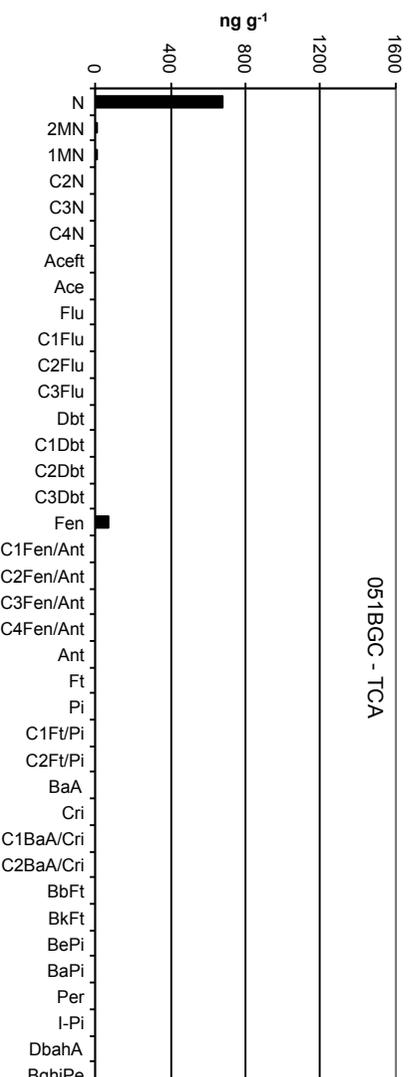
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

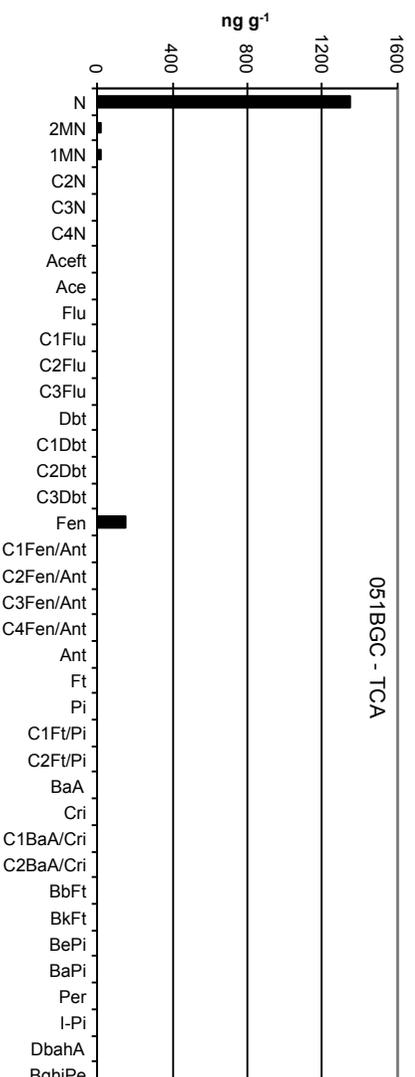
Amostra 051BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenaftileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

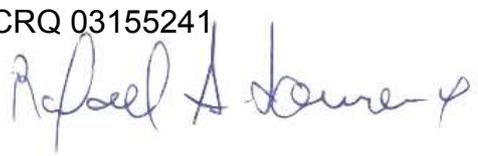
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	349/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	073BGC / 28456
Data de Coleta	01/09/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	073BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	1366,2
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	23,68
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	21,12
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	63,64
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	161,64
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	50,44
Pireno	0,1	9,0	22,68
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			1664,6
Σ HPA			1709,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			62,7
Lipídios (%)			16,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

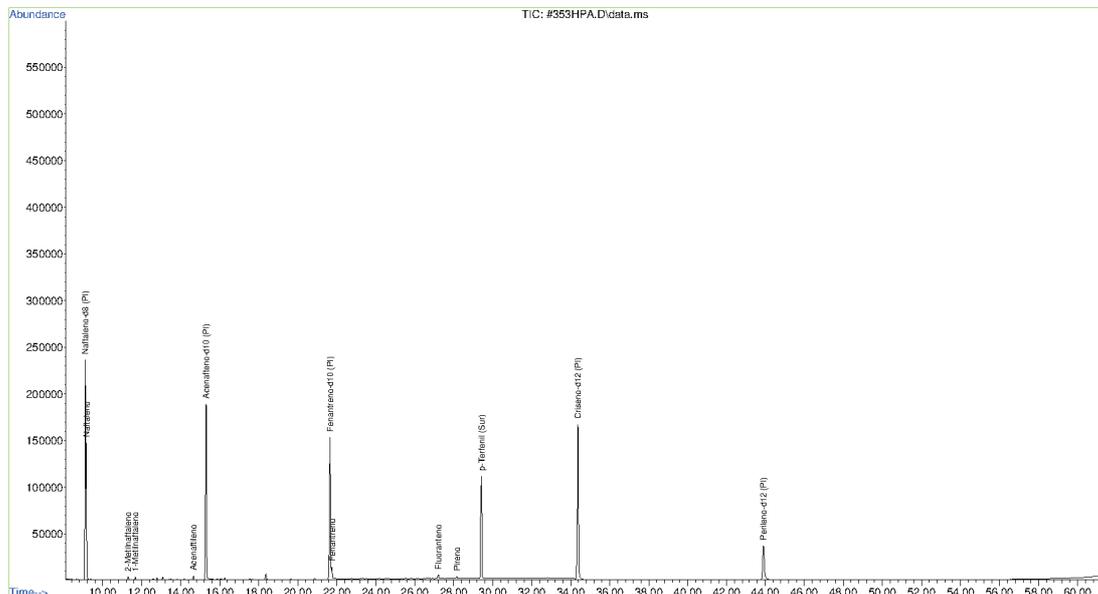
Biópsia (SiSPMC) /Tecido	073BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,6	24,1	3663,8
2-Metilnaftaleno	1,6	24,1	63,5
1-Metilnaftaleno	1,6	24,1	56,6
C2-Naftaleno	1,6	24,1	<1,6
C3-Naftaleno	1,6	24,1	<1,6
C4-Naftaleno	1,6	24,1	<1,6
Acenaftileno	0,3	24,1	170,7
Acenafteno	0,3	24,1	<0,3
Fluoreno	0,2	24,1	<0,2
C1-Fluoreno	0,2	24,1	<0,2
C2-Fluoreno	0,2	24,1	<0,2
C3-Fluoreno	0,2	24,1	<0,2
Dibenzotiofeno	0,5	24,1	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	24,1	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	24,1	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	24,1	<0,5
Fenantreno	0,8	24,1	433,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,8	24,1	<0,8
C2-Fenantreno-antraceno	0,8	24,1	<0,8
C3-Fenantreno-antraceno	0,8	24,1	<0,8
C4-Fenantreno-antraceno	0,8	24,1	<0,8
Antraceno	0,3	24,1	<0,3
Fluoranteno	0,5	24,1	135,3
Pireno	0,3	24,1	60,8
C1-Fluoranteno-pireno	0,5	24,1	<0,5
C2-Fluoranteno-pireno	0,5	24,1	<0,5
Benzo(a)antraceno	0,8	24,1	<0,8
Criseno	0,8	24,1	<0,8
C1-Criseno	0,8	24,1	<0,8
C2-Criseno	0,8	24,1	<0,8
Benzo(b)fluoranteno	0,5	24,1	<0,5
Benzo(k)fluoranteno	0,5	24,1	<0,5
Benzo(e)pireno	0,2	24,1	<0,2
Benzo(a)pireno	0,2	24,1	<0,2
Perileno	0,2	24,1	<0,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	24,1	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	24,1	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,2	24,1	<0,2
Σ16 HPA Prioritários			4464,1
Σ HPA			4584,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			62,7
Lipídios (%)			16,4

TCA = Amostra de Gordura

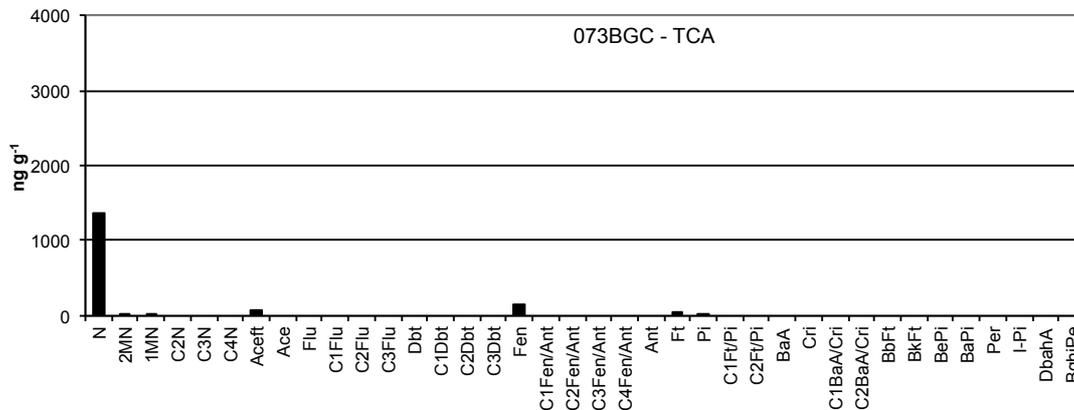
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

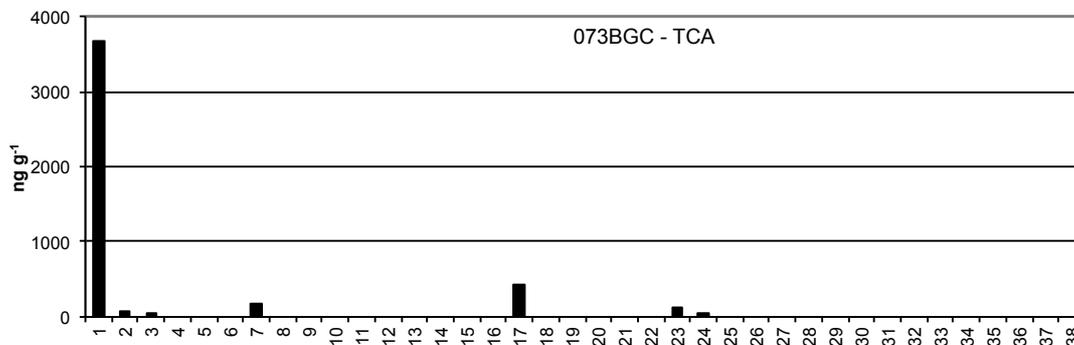
Amostra 073BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM) Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenaftileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

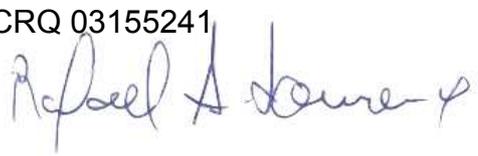
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	350/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	074BGC / 28459
Data de Coleta	01/09/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	074BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			76
Umidade (%)			47,2
Lipídios (%)			25,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	074BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,1	17,1	<1,1
2-Metilnaftaleno	1,1	17,1	<1,1
1-Metilnaftaleno	1,1	17,1	<1,1
C2-Naftaleno	1,1	17,1	<1,1
C3-Naftaleno	1,1	17,1	<1,1
C4-Naftaleno	1,1	17,1	<1,1
Acenaftileno	0,2	17,1	<0,2
Acenafteno	0,2	17,1	<0,2
Fluoreno	0,1	17,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	17,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	17,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	17,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	17,1	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	17,1	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	17,1	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	17,1	<0,4
Fenantreno	0,6	17,1	<0,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	17,1	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	17,1	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	17,1	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	17,1	<0,6
Antraceno	0,2	17,1	<0,2
Fluoranteno	0,3	17,1	<0,3
Pireno	0,2	17,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	17,1	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	17,1	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	17,1	<0,6
Criseno	0,6	17,1	<0,6
C1-Criseno	0,6	17,1	<0,6
C2-Criseno	0,6	17,1	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	17,1	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	17,1	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	17,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	17,1	<0,1
Perileno	0,1	17,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	17,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	17,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	17,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			76
Umidade (%)			47,2
Lipídios (%)			25,6

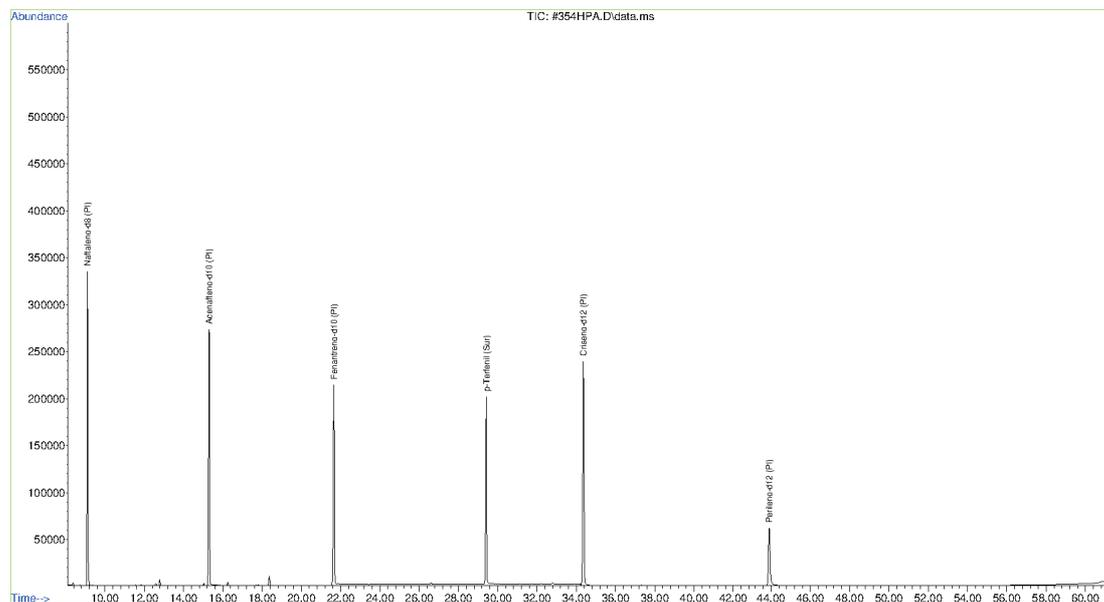
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 074BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

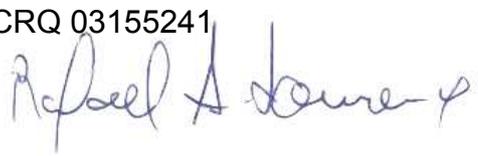
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	351/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	078BGC / 28463
Data de Coleta	02/09/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	078BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			84,2
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	078BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	3,8	56,9	<3,8
2-Metilnaftaleno	3,8	56,9	<3,8
1-Metilnaftaleno	3,8	56,9	<3,8
C2-Naftaleno	3,8	56,9	<3,8
C3-Naftaleno	3,8	56,9	<3,8
C4-Naftaleno	3,8	56,9	<3,8
Acenaftileno	0,8	56,9	<0,8
Acenafteno	0,8	56,9	<0,8
Fluoreno	0,4	56,9	<0,4
C1-Fluoreno	0,4	56,9	<0,4
C2-Fluoreno	0,4	56,9	<0,4
C3-Fluoreno	0,4	56,9	<0,4
Dibenzotiofeno	1,2	56,9	<1,2
C1-Dibenzotiofeno	1,2	56,9	<1,2
C2-Dibenzotiofeno	1,2	56,9	<1,2
C3-Dibenzotiofeno	1,2	56,9	<1,2
Fenantreno	1,9	56,9	<1,9
C1-Fenantreno-antraceno	1,9	56,9	<1,9
C2-Fenantreno-antraceno	1,9	56,9	<1,9
C3-Fenantreno-antraceno	1,9	56,9	<1,9
C4-Fenantreno-antraceno	1,9	56,9	<1,9
Antraceno	0,8	56,9	<0,8
Fluoranteno	1,1	56,9	<1,1
Pireno	0,8	56,9	<0,8
C1-Fluoranteno-pireno	1,1	56,9	<1,1
C2-Fluoranteno-pireno	1,1	56,9	<1,1
Benzo(a)antraceno	1,9	56,9	<1,9
Criseno	1,9	56,9	<1,9
C1-Criseno	1,9	56,9	<1,9
C2-Criseno	1,9	56,9	<1,9
Benzo(b)fluoranteno	1,1	56,9	<1,1
Benzo(k)fluoranteno	1,1	56,9	<1,1
Benzo(e)pireno	0,4	56,9	<0,4
Benzo(a)pireno	0,4	56,9	<0,4
Perileno	0,4	56,9	<0,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,8	56,9	<0,8
Dibenzo(a,h)antraceno	0,8	56,9	<0,8
Benzo(g,h,i)perileno	0,4	56,9	<0,4
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			84,2
Lipídios (%)			2,0

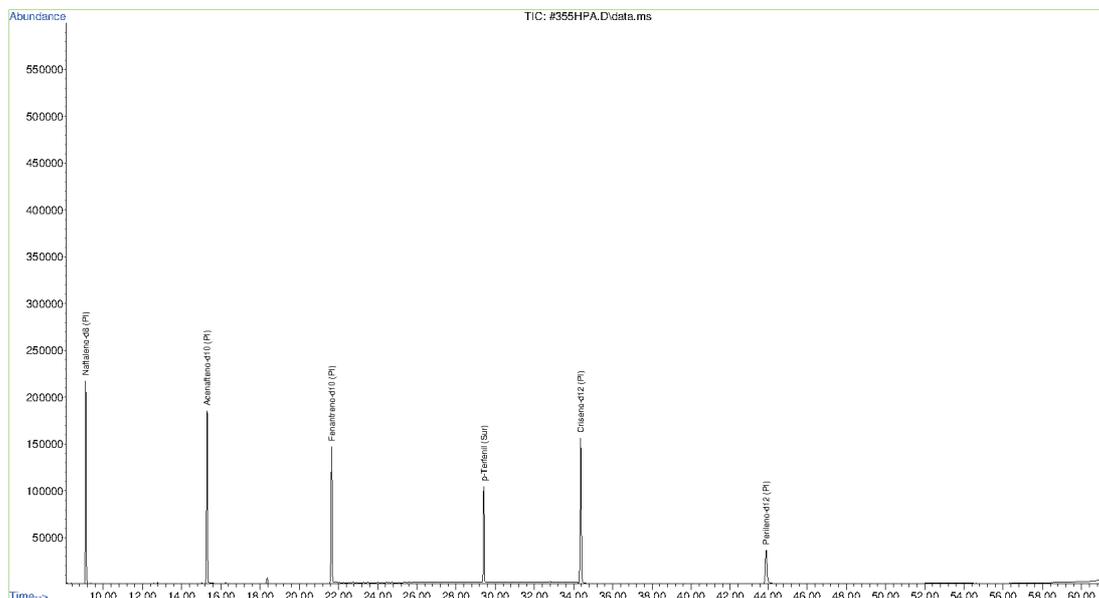
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 078BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

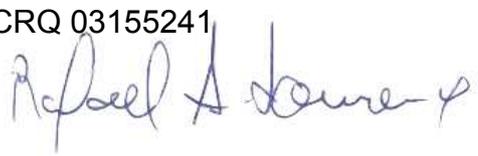
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	352/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	088BGC / 29688
Data de Coleta	05/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	088BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			53
Umidade (%)			60,0
Lipídios (%)			16,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	088BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,5	22,5	<1,5
2-Metilnaftaleno	1,5	22,5	<1,5
1-Metilnaftaleno	1,5	22,5	<1,5
C2-Naftaleno	1,5	22,5	<1,5
C3-Naftaleno	1,5	22,5	<1,5
C4-Naftaleno	1,5	22,5	<1,5
Acenaftileno	0,3	22,5	<0,3
Acenafteno	0,3	22,5	<0,3
Fluoreno	0,2	22,5	<0,2
C1-Fluoreno	0,2	22,5	<0,2
C2-Fluoreno	0,2	22,5	<0,2
C3-Fluoreno	0,2	22,5	<0,2
Dibenzotiofeno	0,5	22,5	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	22,5	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	22,5	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	22,5	<0,5
Fenantreno	0,7	22,5	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	22,5	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	22,5	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	22,5	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	22,5	<0,7
Antraceno	0,3	22,5	<0,3
Fluoranteno	0,4	22,5	<0,4
Pireno	0,3	22,5	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	22,5	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	22,5	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	22,5	<0,7
Criseno	0,7	22,5	<0,7
C1-Criseno	0,7	22,5	<0,7
C2-Criseno	0,7	22,5	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	22,5	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	22,5	<0,4
Benzo(e)pireno	0,2	22,5	<0,2
Benzo(a)pireno	0,2	22,5	<0,2
Perileno	0,2	22,5	<0,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	22,5	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	22,5	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,2	22,5	<0,2
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			53
Umidade (%)			60,0
Lipídios (%)			16,8

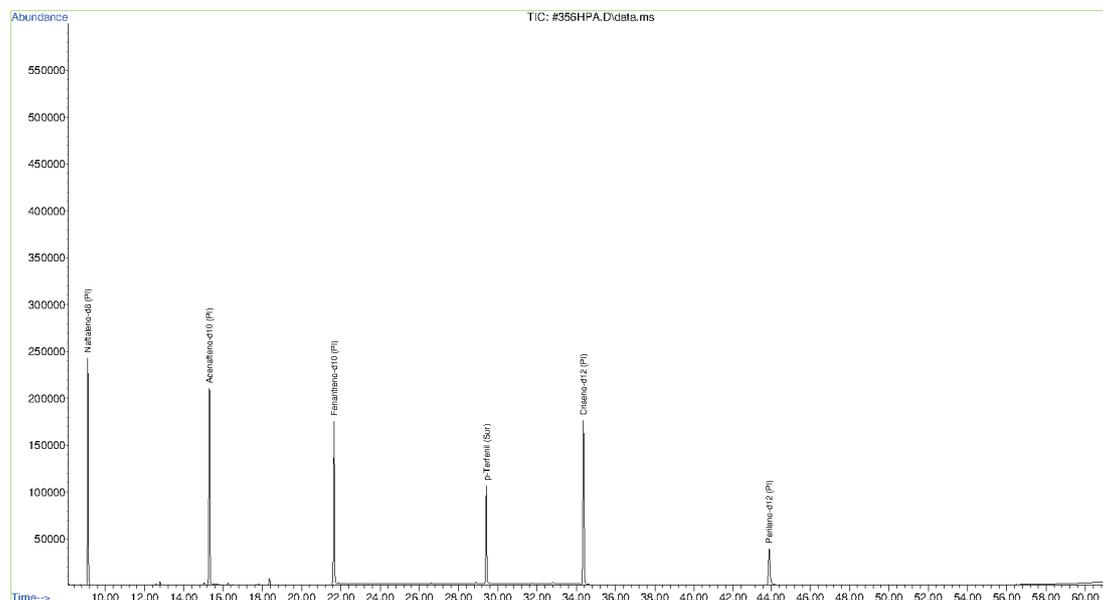
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 088BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

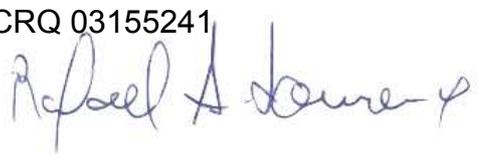
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	353/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	104BGC – 105G / 29761
Data de Coleta	14/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	104BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			25,9
Lipídios (%)			37,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	104BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,1	<0,2
Acenafteno	0,2	12,1	<0,2
Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
Fenantreno	0,4	12,1	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
Antraceno	0,2	12,1	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Pireno	0,2	12,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,1	<0,4
Criseno	0,4	12,1	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,1	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,1	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,1	<0,1
Perileno	0,1	12,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			25,9
Lipídios (%)			37,2

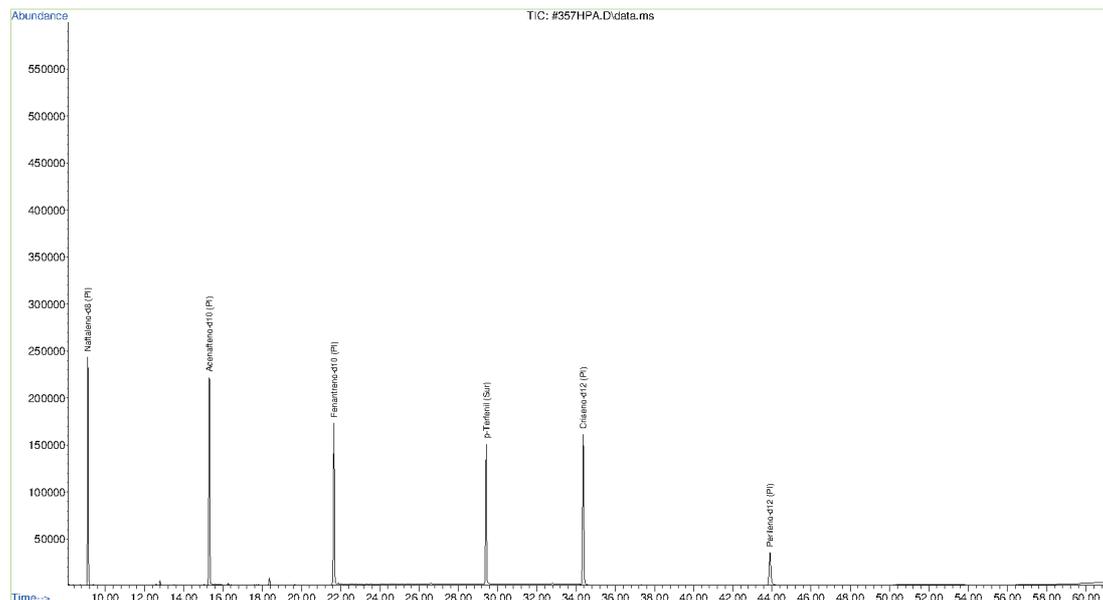
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 104GCB – 105G – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafeno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralorchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

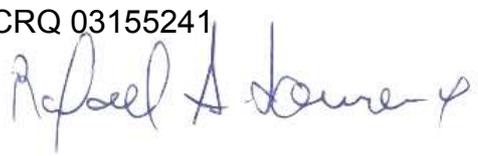
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	354/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	107BGC / 29765
Data de Coleta	14/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	107BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			46,9
Lipídios (%)			8,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	107BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,1	16,9	<1,1
2-Metilnaftaleno	1,1	16,9	<1,1
1-Metilnaftaleno	1,1	16,9	<1,1
C2-Naftaleno	1,1	16,9	<1,1
C3-Naftaleno	1,1	16,9	<1,1
C4-Naftaleno	1,1	16,9	<1,1
Acenaftileno	0,2	16,9	<0,2
Acenafteno	0,2	16,9	<0,2
Fluoreno	0,1	16,9	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	16,9	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	16,9	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	16,9	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	16,9	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	16,9	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	16,9	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	16,9	<0,4
Fenantreno	0,6	16,9	<0,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	16,9	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	16,9	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	16,9	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	16,9	<0,6
Antraceno	0,2	16,9	<0,2
Fluoranteno	0,3	16,9	<0,3
Pireno	0,2	16,9	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	16,9	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	16,9	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	16,9	<0,6
Criseno	0,6	16,9	<0,6
C1-Criseno	0,6	16,9	<0,6
C2-Criseno	0,6	16,9	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	16,9	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	16,9	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	16,9	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	16,9	<0,1
Perileno	0,1	16,9	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	16,9	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	16,9	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	16,9	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			46,9
Lipídios (%)			8,4

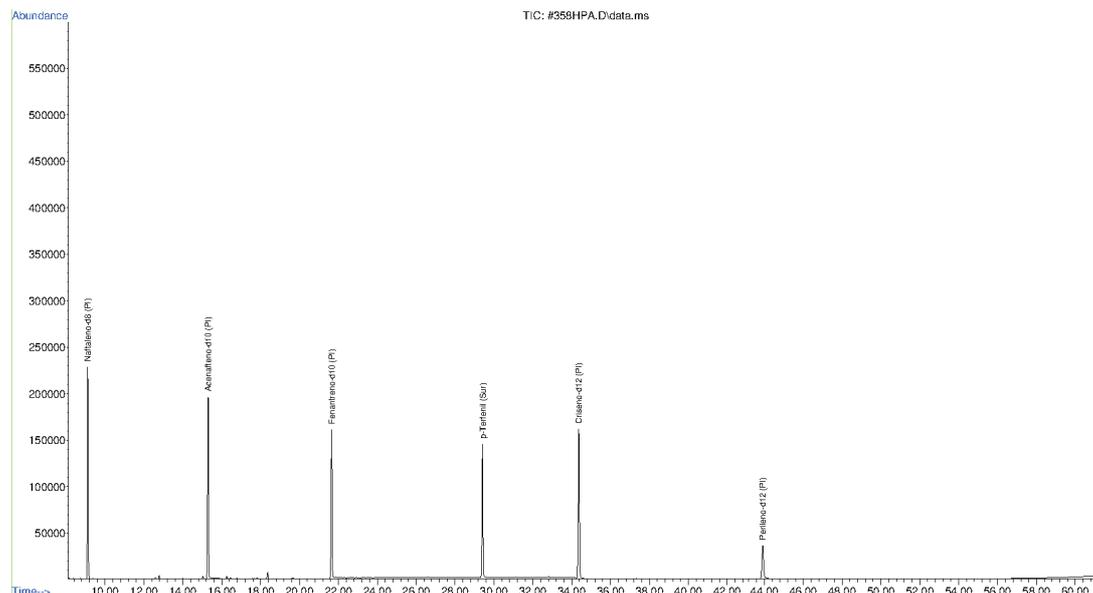
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 107BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

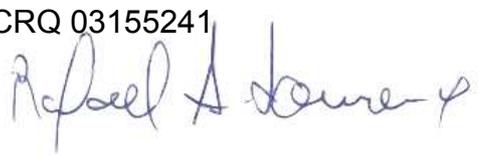
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	355/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	109BGC / 29766
Data de Coleta	14/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	109BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			73
Umidade (%)			54,3
Lipídios (%)			12,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	109BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,3	19,7	<1,3
2-Metilnaftaleno	1,3	19,7	<1,3
1-Metilnaftaleno	1,3	19,7	<1,3
C2-Naftaleno	1,3	19,7	<1,3
C3-Naftaleno	1,3	19,7	<1,3
C4-Naftaleno	1,3	19,7	<1,3
Acenaftileno	0,3	19,7	<0,3
Acenafteno	0,3	19,7	<0,3
Fluoreno	0,1	19,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	19,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	19,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	19,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	19,7	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	19,7	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	19,7	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	19,7	<0,4
Fenantreno	0,7	19,7	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	19,7	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	19,7	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	19,7	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	19,7	<0,7
Antraceno	0,3	19,7	<0,3
Fluoranteno	0,4	19,7	<0,4
Pireno	0,3	19,7	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	19,7	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	19,7	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	19,7	<0,7
Criseno	0,7	19,7	<0,7
C1-Criseno	0,7	19,7	<0,7
C2-Criseno	0,7	19,7	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	19,7	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	19,7	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	19,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	19,7	<0,1
Perileno	0,1	19,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	19,7	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	19,7	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	19,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			73
Umidade (%)			54,3
Lipídios (%)			12,4

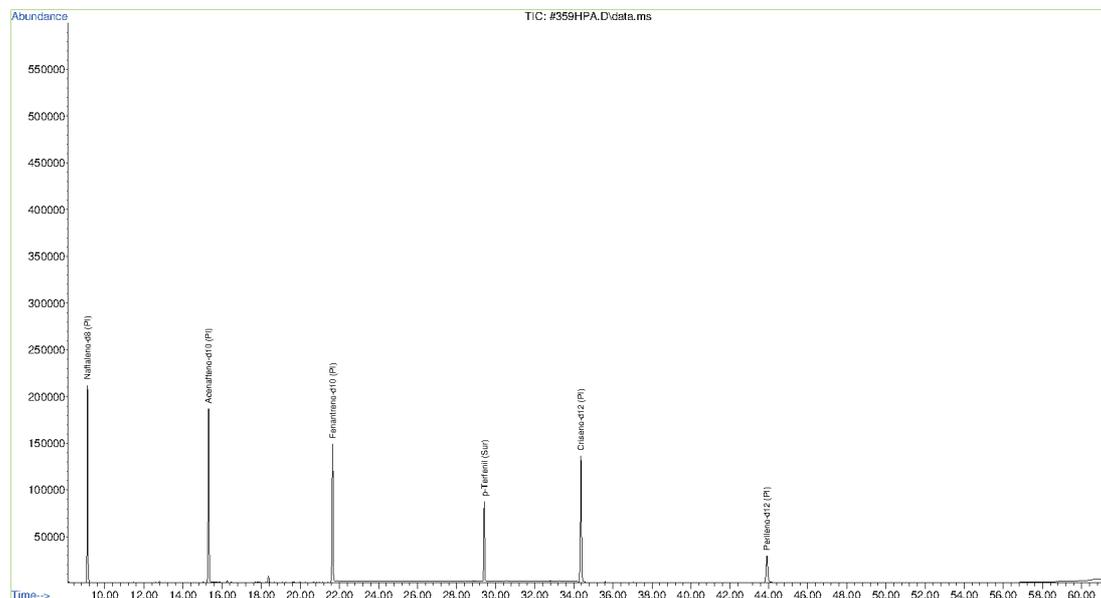
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 109BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

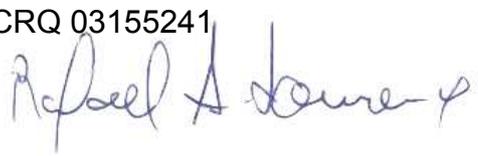
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	356/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	113BGC / 29826
Data de Coleta	24/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	113BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			0,7
Lipídios (%)			20,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

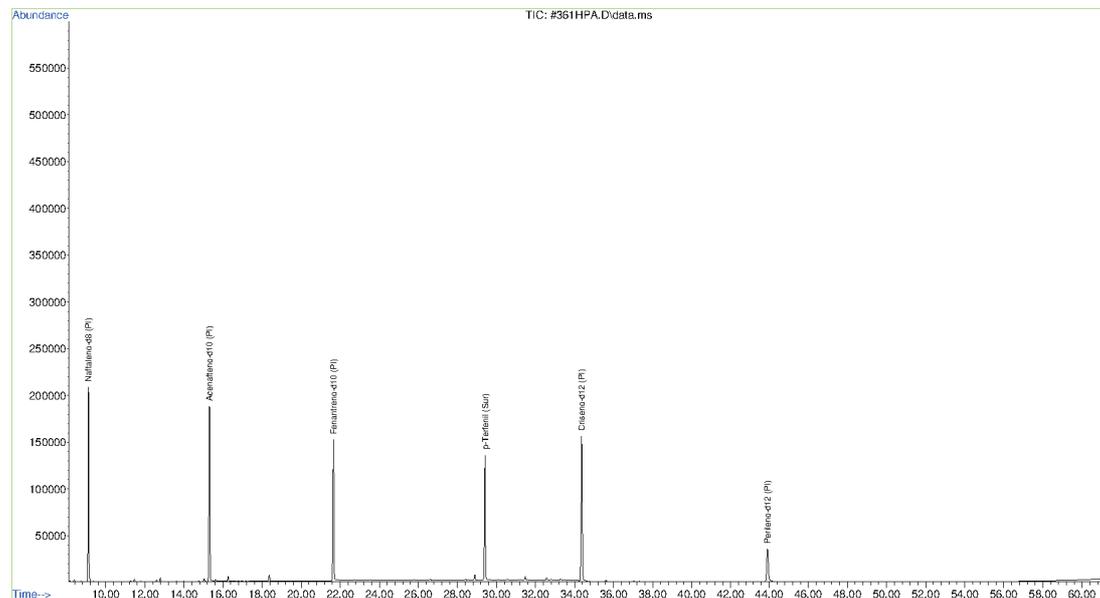
Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	113BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,1	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,1	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,1	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,1	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,1	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,1	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,1	<0,1
Acenafteno	0,1	9,1	<0,1
Fluoreno	0,1	9,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,1	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,1	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,1	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,1	<0,2
Fenantreno	0,3	9,1	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,1	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,1	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,1	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,1	<0,3
Antraceno	0,1	9,1	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,1	<0,2
Pireno	0,1	9,1	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,1	<0,3
Criseno	0,3	9,1	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,1	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,1	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,1	<0,1
Perileno	0,1	9,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,1	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,1	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			0,7
Lipídios (%)			20,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 113BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

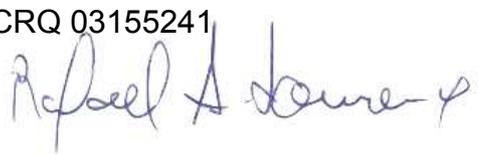
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	357/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	114BGC / 29826
Data de Coleta	24/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	114BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			55
Umidade (%)			54,9
Lipídios (%)			14,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

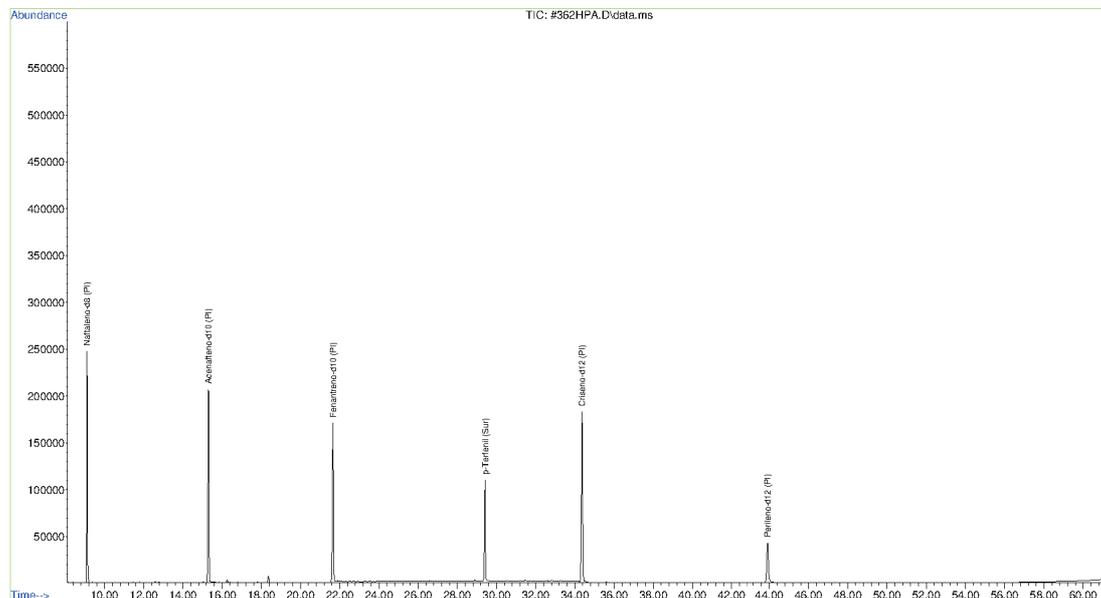
Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	114BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,3	20,0	<1,3
2-Metilnaftaleno	1,3	20,0	<1,3
1-Metilnaftaleno	1,3	20,0	<1,3
C2-Naftaleno	1,3	20,0	<1,3
C3-Naftaleno	1,3	20,0	<1,3
C4-Naftaleno	1,3	20,0	<1,3
Acenaftileno	0,3	20,0	<0,3
Acenafteno	0,3	20,0	<0,3
Fluoreno	0,1	20,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	20,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	20,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	20,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	20,0	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	20,0	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	20,0	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	20,0	<0,4
Fenantreno	0,7	20,0	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	20,0	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	20,0	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	20,0	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	20,0	<0,7
Antraceno	0,3	20,0	<0,3
Fluoranteno	0,4	20,0	<0,4
Pireno	0,3	20,0	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	20,0	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	20,0	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	20,0	<0,7
Criseno	0,7	20,0	<0,7
C1-Criseno	0,7	20,0	<0,7
C2-Criseno	0,7	20,0	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	20,0	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	20,0	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	20,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	20,0	<0,1
Perileno	0,1	20,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	20,0	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	20,0	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	20,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			55
Umidade (%)			54,9
Lipídios (%)			14,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 114BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

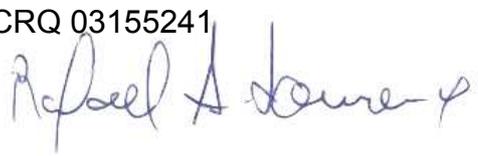
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	358/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	127BGC / 30510
Data de Coleta	16/04/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	127BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			63,9
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

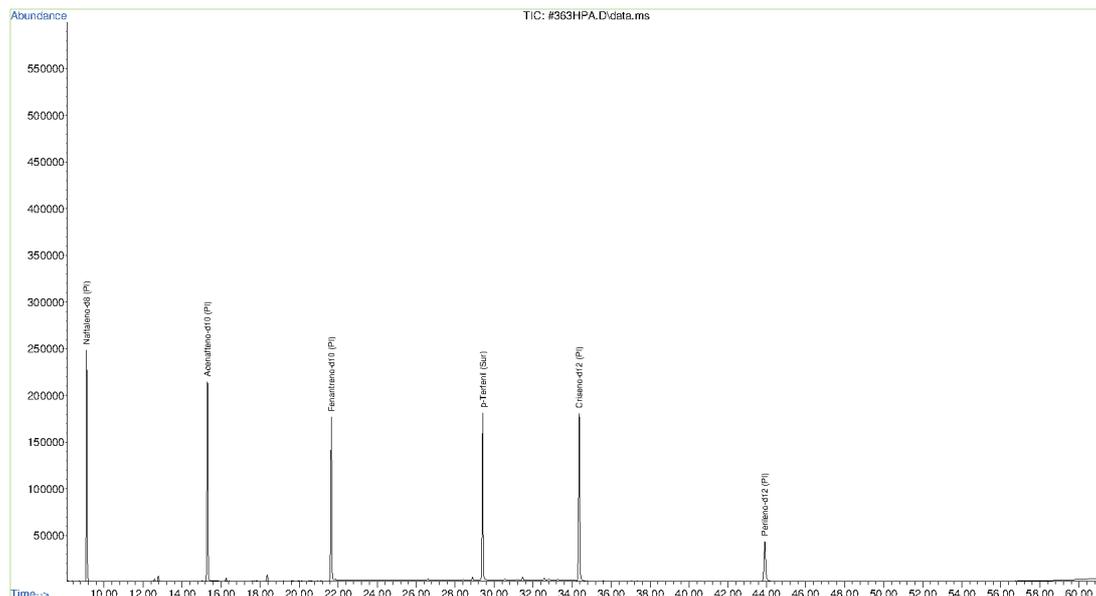
Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	127BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,7	24,9	<1,7
2-Metilnaftaleno	1,7	24,9	<1,7
1-Metilnaftaleno	1,7	24,9	<1,7
C2-Naftaleno	1,7	24,9	<1,7
C3-Naftaleno	1,7	24,9	<1,7
C4-Naftaleno	1,7	24,9	<1,7
Acenaftileno	0,3	24,9	<0,3
Acenafteno	0,3	24,9	<0,3
Fluoreno	0,2	24,9	<0,2
C1-Fluoreno	0,2	24,9	<0,2
C2-Fluoreno	0,2	24,9	<0,2
C3-Fluoreno	0,2	24,9	<0,2
Dibenzotiofeno	0,5	24,9	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	24,9	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	24,9	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	24,9	<0,5
Fenantreno	0,8	24,9	<0,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,8	24,9	<0,8
C2-Fenantreno-antraceno	0,8	24,9	<0,8
C3-Fenantreno-antraceno	0,8	24,9	<0,8
C4-Fenantreno-antraceno	0,8	24,9	<0,8
Antraceno	0,3	24,9	<0,3
Fluoranteno	0,5	24,9	<0,5
Pireno	0,3	24,9	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,5	24,9	<0,5
C2-Fluoranteno-pireno	0,5	24,9	<0,5
Benzo(a)antraceno	0,8	24,9	<0,8
Criseno	0,8	24,9	<0,8
C1-Criseno	0,8	24,9	<0,8
C2-Criseno	0,8	24,9	<0,8
Benzo(b)fluoranteno	0,5	24,9	<0,5
Benzo(k)fluoranteno	0,5	24,9	<0,5
Benzo(e)pireno	0,2	24,9	<0,2
Benzo(a)pireno	0,2	24,9	<0,2
Perileno	0,2	24,9	<0,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	24,9	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	24,9	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,2	24,9	<0,2
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			63,9
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 127BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

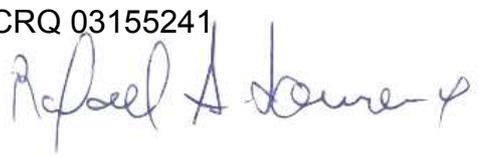
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	359/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	165BGC / 30739
Data de Coleta	16/04/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	29/01/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	10/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	165BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			59,4
Lipídios (%)			18,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

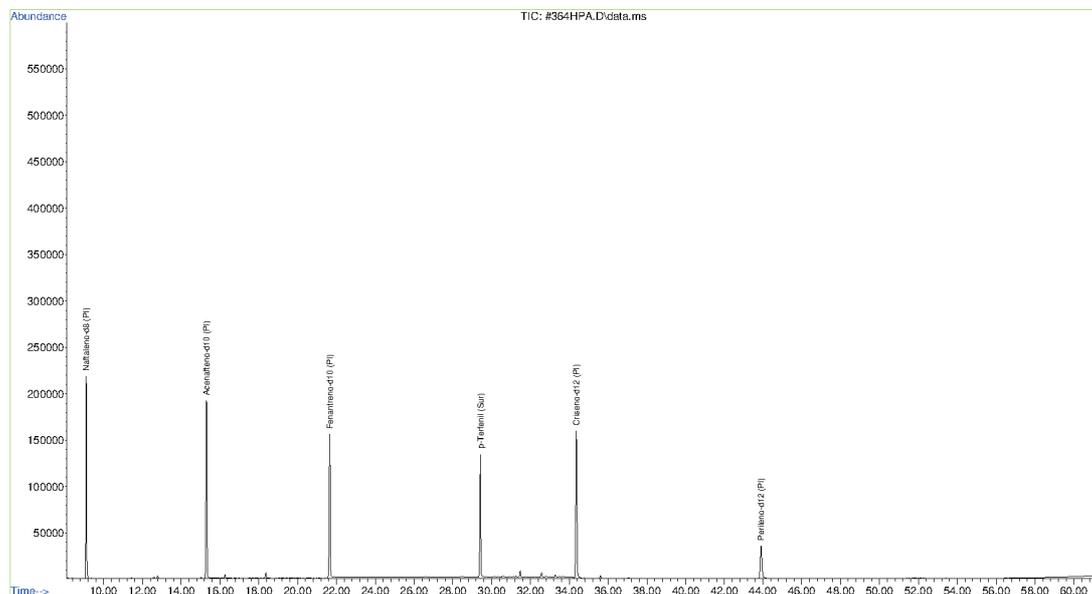
Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	165BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,5	22,2	<1,5
2-Metilnaftaleno	1,5	22,2	<1,5
1-Metilnaftaleno	1,5	22,2	<1,5
C2-Naftaleno	1,5	22,2	<1,5
C3-Naftaleno	1,5	22,2	<1,5
C4-Naftaleno	1,5	22,2	<1,5
Acenaftileno	0,3	22,2	<0,3
Acenafteno	0,3	22,2	<0,3
Fluoreno	0,1	22,2	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	22,2	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	22,2	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	22,2	<0,1
Dibenzotiofeno	0,5	22,2	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	22,2	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	22,2	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	22,2	<0,5
Fenantreno	0,7	22,2	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	22,2	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	22,2	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	22,2	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	22,2	<0,7
Antraceno	0,3	22,2	<0,3
Fluoranteno	0,4	22,2	<0,4
Pireno	0,3	22,2	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	22,2	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	22,2	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	22,2	<0,7
Criseno	0,7	22,2	<0,7
C1-Criseno	0,7	22,2	<0,7
C2-Criseno	0,7	22,2	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	22,2	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	22,2	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	22,2	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	22,2	<0,1
Perileno	0,1	22,2	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	22,2	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	22,2	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	22,2	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			59,4
Lipídios (%)			18,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 165BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 48821 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,3	50,0	62,6	34,4	50,0	68,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	33,6	50,0	67,2	39,6	50,0	79,2
Acenafeno	<0,1	<0,1	35,4	50,0	70,8	31,9	50,0	63,8
Fluoreno	<0,1	<0,1	36,9	50,0	73,8	34,3	50,0	68,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	37,5	50,0	75,0	39,8	50,0	79,6
Fenantreno	<0,3	<0,3	37,0	50,0	74,0	45,5	50,0	91,1
Antraceno	<0,1	<0,1	34,9	50,0	69,8	39,6	50,0	79,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,4	50,0	80,8	37,6	50,0	75,2
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	31,5	50,0	63,1
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	46,9	50,0	93,8	34,9	50,0	69,7
Criseno	<0,3	<0,3	47,0	50,0	94,0	31,3	50,0	62,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	46,4	50,0	92,8	39,1	50,0	78,3
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,1	50,0	88,2	30,2	50,0	60,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,8	41,6	50,0	83,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	44,0	50,0	88,0	46,1	50,0	92,3
Perileno	<0,1	<0,1	42,8	50,0	85,6	35,3	50,0	70,5
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,4	30,0	50,0	60,1
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	41,8	50,0	83,6	34,6	50,0	69,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	42,2	50,0	84,4	30,8	50,0	61,7

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 015.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

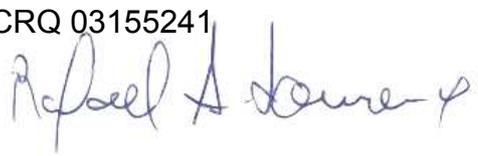
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	360/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	058BGC / 28322
Data de Coleta	17/08/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	058BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	1998,5
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	35,2
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	35,7
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<9,0
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	206,8
Acenafteno	0,1	9,0	15,8
Fluoreno	0,1	9,0	15,4
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	363,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	14,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	169,9
Pireno	0,1	9,0	94,5
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	14,9
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<9,0
Criseno	0,3	9,0	31,1
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	21,6
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	15,7
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	20,8
Σ16 HPA Prioritários			2932,0
Σ HPA			3053,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			35,8
Lipídios (%)			22,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

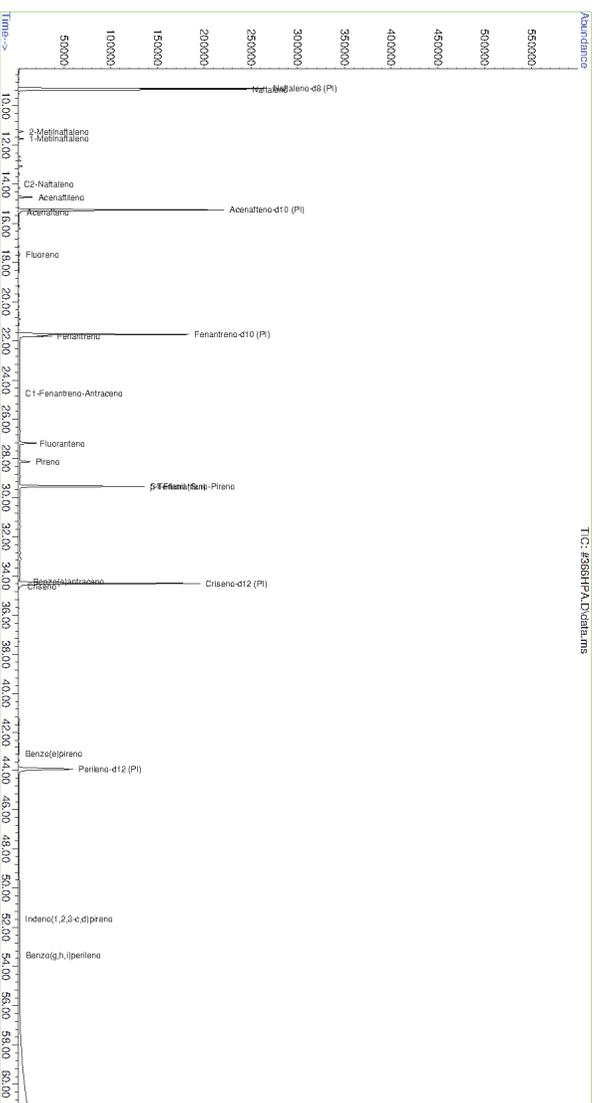
Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	058BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	14,0	3113,6
2-Metilnaftaleno	0,9	14,0	54,9
1-Metilnaftaleno	0,9	14,0	55,7
C2-Naftaleno	0,9	14,0	<14
C3-Naftaleno	0,9	14,0	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	14,0	<0,9
Acenaftileno	0,2	14,0	322,2
Acenafteno	0,2	14,0	24,6
Fluoreno	0,1	14,0	24,0
C1-Fluoreno	0,1	14,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,0	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,0	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,0	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,0	<0,3
Fenantreno	0,5	14,0	566,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,0	22,1
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,0	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,0	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,0	<0,5
Antraceno	0,2	14,0	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,0	264,7
Pireno	0,2	14,0	147,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,0	23,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,0	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,0	<14
Criseno	0,5	14,0	48,5
C1-Criseno	0,5	14,0	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,0	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,0	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,0	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,0	33,7
Benzo(a)pireno	0,1	14,0	<0,1
Perileno	0,1	14,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,0	24,5
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,0	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,0	32,4
Σ16 HPA Prioritários			4568,0
Σ HPA			4757,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			35,8
Lipídios (%)			22,0

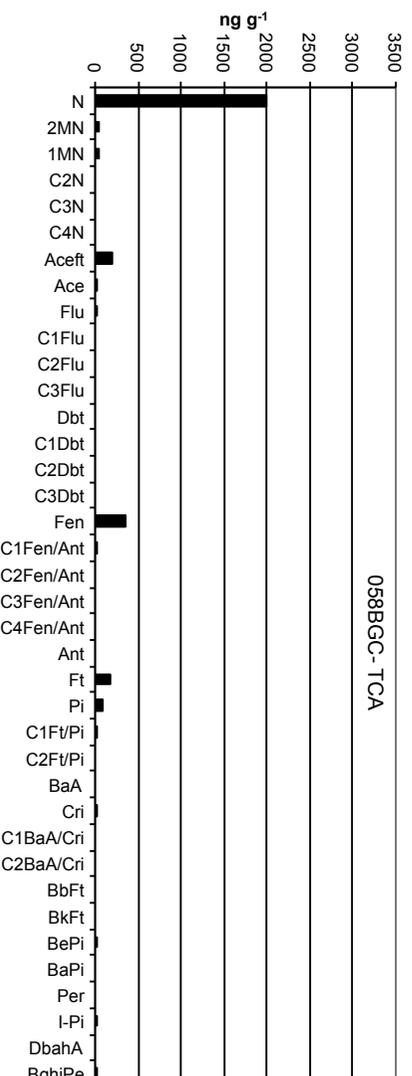
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

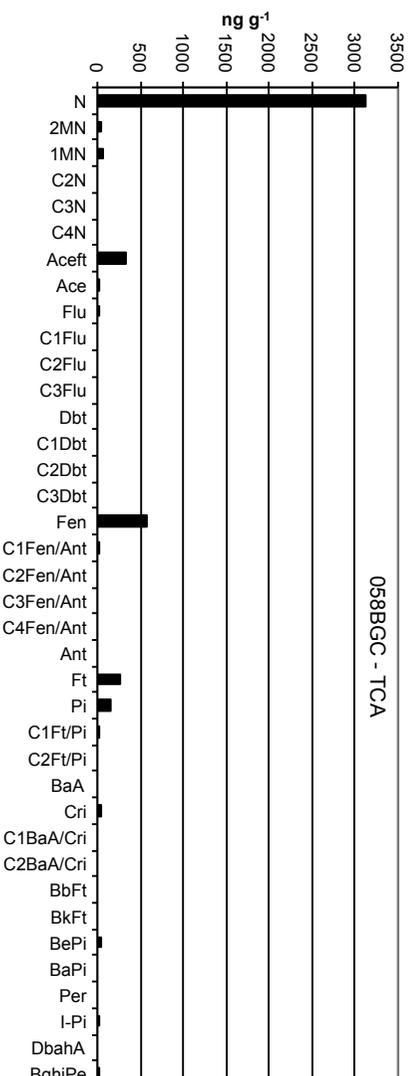
Amostra 058BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)





Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco		Concentração		Recuperação (%)	Amostra 32792		Concentração		Recuperação (%)
	Análítico	Esperada	Fortificado	Esperada		(TCA) Fortificada	Esperada			
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9		
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6		
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9		
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5		
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1		
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9		
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0		
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6		
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6		
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6		
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6		
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2		
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8		
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1		
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3		
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8		
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4		
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2		
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4		

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

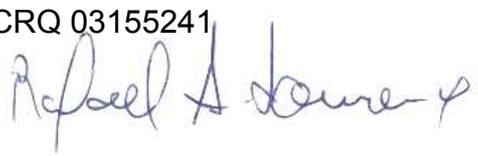
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	361/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	099BGC / 29743
Data de Coleta	12/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	099BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	567,7
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<9,0
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	9,0
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	30,3
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	78,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	33,5
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			710,1
Σ HPA			719,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			57
Umidade (%)			31,9
Lipídios (%)			20,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

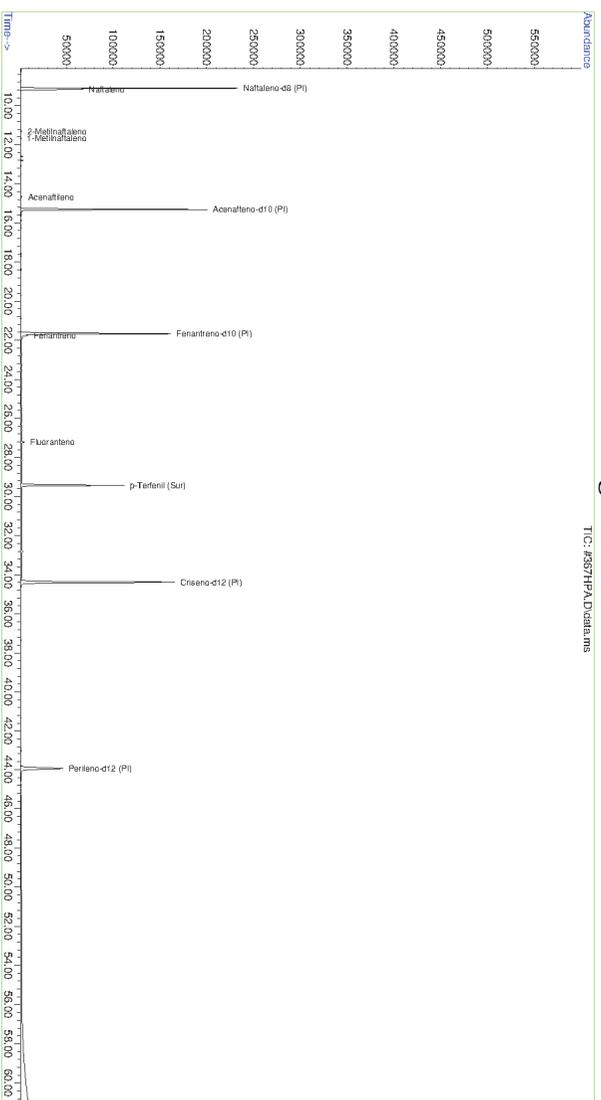
Código da Biópsia (SIsPMC)/Tecido	099BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,2	833,6
2-Metilnaftaleno	0,9	13,2	<13,2
1-Metilnaftaleno	0,9	13,2	13,2
C2-Naftaleno	0,9	13,2	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,2	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,2	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,2	44,5
Acenafteno	0,2	13,2	<0,2
Fluoreno	0,1	13,2	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,2	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,2	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,2	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,2	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,2	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,2	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,2	<0,3
Fenantreno	0,4	13,2	115,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,2	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,2	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,2	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,2	<0,4
Antraceno	0,2	13,2	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,2	49,2
Pireno	0,2	13,2	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,2	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,2	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,2	<0,4
Criseno	0,4	13,2	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,2	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,2	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,2	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,2	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,2	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,2	<0,1
Perileno	0,1	13,2	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,2	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,2	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,2	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1042,6
Σ HPA			1055,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			57
Umidade (%)			31,9
Lipídios (%)			20,8

TCA = Amostra de Gordura

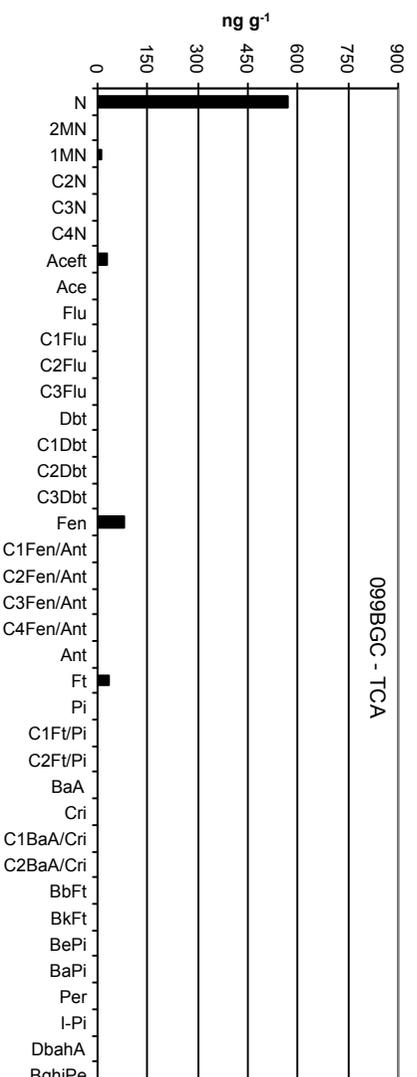
LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

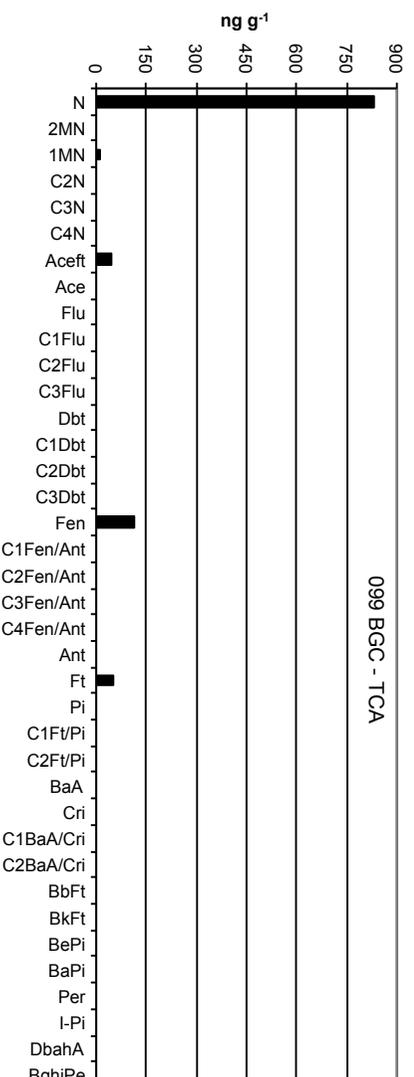
Amostra 099BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- $d_{12,0}$ e Perileno- $d_{12,0}$, concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco		Concentração		Recuperação (%)	Amostra 32792		Concentração		Recuperação (%)
	Análítico	Esperada	Fortificado	Esperada		(TCA) Fortificada	Esperada			
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9		
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6		
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9		
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5		
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1		
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9		
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0		
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6		
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6		
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6		
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6		
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2		
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8		
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1		
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3		
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8		
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4		
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2		
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4		

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

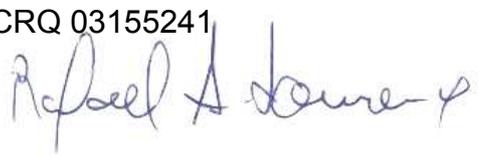
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	362/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	110BGC / 29779
Data de Coleta	16/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	110BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	1555,0
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	32,7
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	30,9
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	173,4
Acenafteno	0,1	9,0	14,3
Fluoreno	0,1	9,0	15,3
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	221,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	90,0
Pireno	0,1	9,0	40,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<9,0
Σ16 HPA Prioritários			2110,0
Σ HPA			2173,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			43,1
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

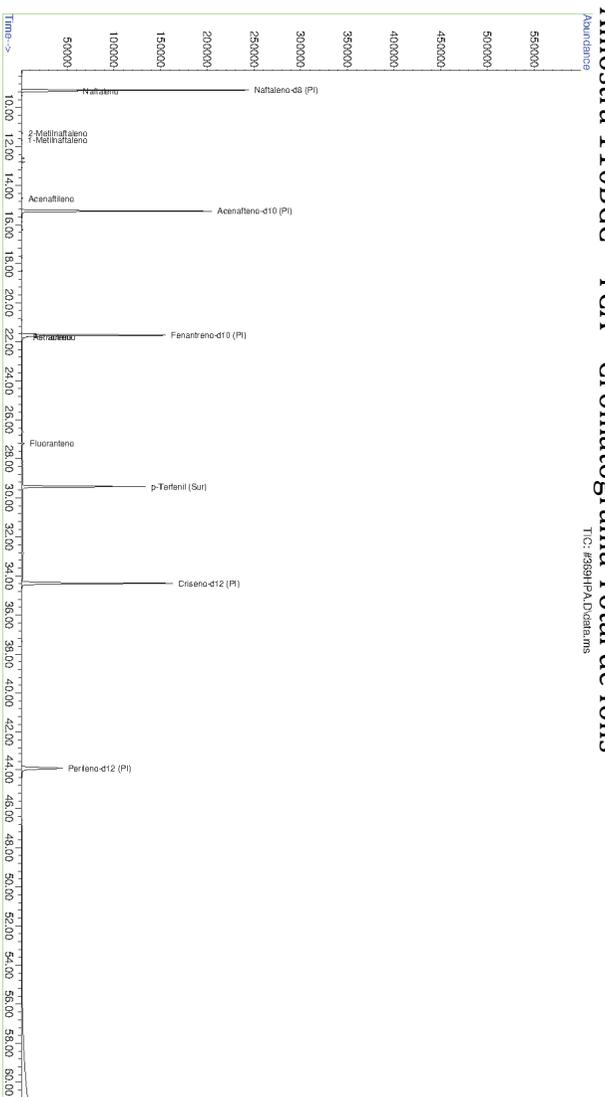
Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	110BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,1	15,8	2733,6
2-Metilnaftaleno	1,1	15,8	57,5
1-Metilnaftaleno	1,1	15,8	54,4
C2-Naftaleno	1,1	15,8	<1,1
C3-Naftaleno	1,1	15,8	<1,1
C4-Naftaleno	1,1	15,8	<1,1
Acenaftileno	0,2	15,8	304,8
Acenafteno	0,2	15,8	25,2
Fluoreno	0,1	15,8	26,9
C1-Fluoreno	0,1	15,8	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	15,8	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	15,8	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	15,8	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	15,8	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	15,8	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	15,8	<0,3
Fenantreno	0,5	15,8	389,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	15,8	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	15,8	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	15,8	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	15,8	<0,5
Antraceno	0,2	15,8	<0,2
Fluoranteno	0,3	15,8	158,1
Pireno	0,2	15,8	71,0
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	15,8	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	15,8	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	15,8	<0,5
Criseno	0,5	15,8	<0,5
C1-Criseno	0,5	15,8	<0,5
C2-Criseno	0,5	15,8	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	15,8	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	15,8	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	15,8	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	15,8	<0,1
Perileno	0,1	15,8	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	15,8	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	15,8	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	15,8	<15,8
Σ16 HPA Prioritários			3709,3
Σ HPA			3821,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			61
Umidade (%)			43,1
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

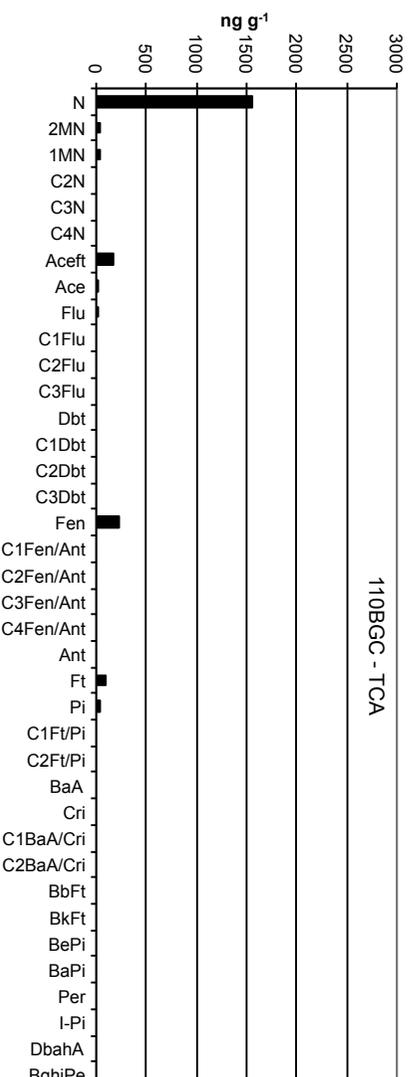
LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 110BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons

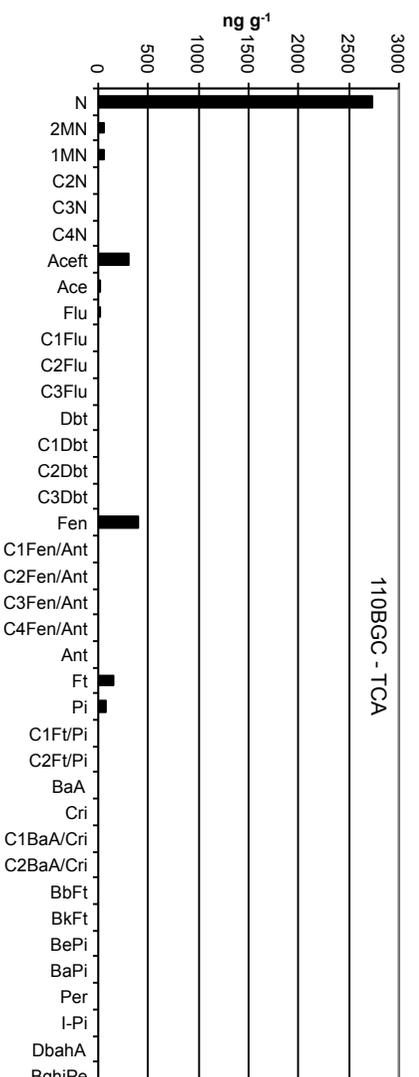
T/C: #9591/PA.D\data.ms



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d_{12,0} e Perileno-d_{12,0}, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco		Concentração		Recuperação (%)	Amostra 32792		Concentração		Recuperação (%)
	Análítico	Esperada	Fortificado	Esperada		(TCA) Fortificada	Esperada	Esperada		
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9		
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6		
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9		
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5		
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1		
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9		
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0		
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6		
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6		
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6		
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6		
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2		
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8		
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1		
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3		
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8		
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4		
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2		
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4		

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. Marine Pollution Bulletin., v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

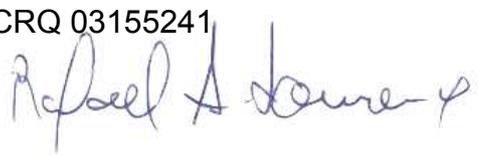


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	363/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	135BGC / 30610
Data de Coleta	11/07/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	135BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	499,1
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<9,0
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<9,0
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	19,6
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	63,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	68,3
Fluoranteno	0,2	9,0	20,6
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			671,0
Σ HPA			671,0
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			40,6
Lipídios (%)			17,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

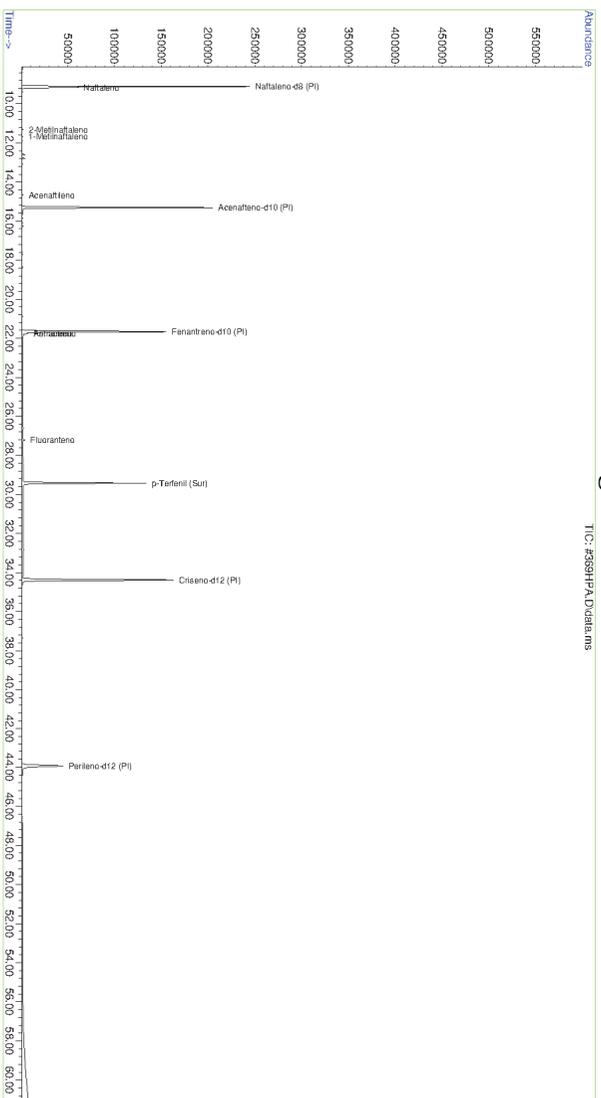
Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	135BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	15,1	839,9
2-Metilnaftaleno	1,0	15,1	<15,1
1-Metilnaftaleno	1,0	15,1	<15,1
C2-Naftaleno	1,0	15,1	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	15,1	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	15,1	<1,0
Acenaftileno	0,2	15,1	33,1
Acenafteno	0,2	15,1	<0,2
Fluoreno	0,1	15,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	15,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	15,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	15,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	15,1	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	15,1	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	15,1	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	15,1	<0,3
Fenantreno	0,5	15,1	106,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	15,1	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	15,1	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	15,1	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	15,1	<0,5
Antraceno	0,2	15,1	114,9
Fluoranteno	0,3	15,1	34,6
Pireno	0,2	15,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	15,1	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	15,1	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	15,1	<0,5
Criseno	0,5	15,1	<0,5
C1-Criseno	0,5	15,1	<0,5
C2-Criseno	0,5	15,1	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	15,1	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	15,1	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	15,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	15,1	<0,1
Perileno	0,1	15,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	15,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	15,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	15,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1129,2
Σ HPA			1129,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			40,6
Lipídios (%)			17,6

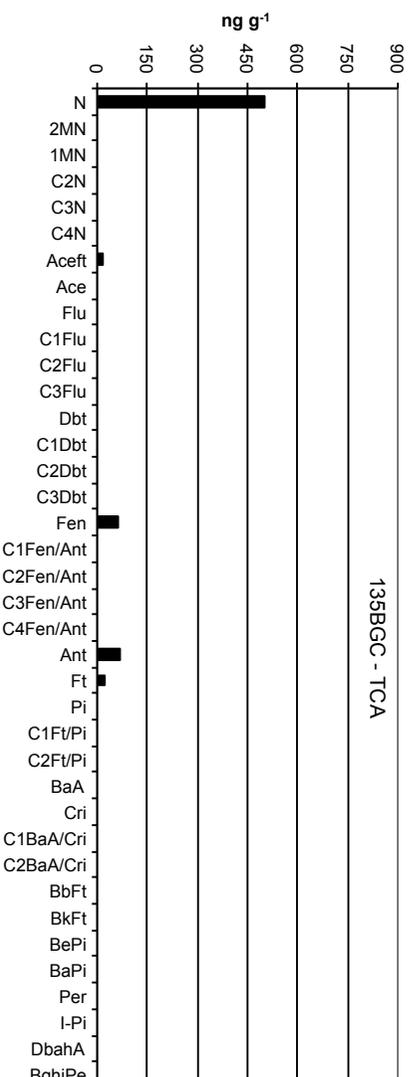
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

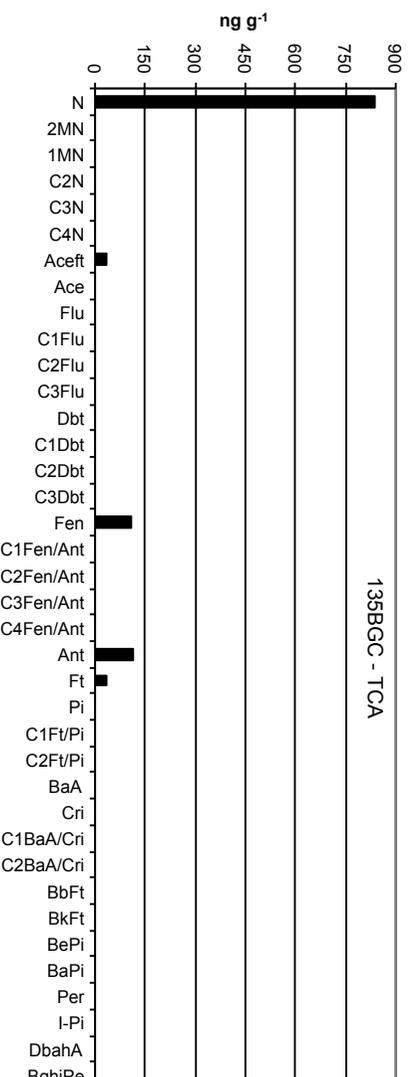
Amostra 135BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- $d_{12,0}$ e Perileno- $d_{12,0}$, concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco		Concentração		Recuperação (%)	Amostra 32792		Concentração		Recuperação (%)
	Análítico	Esperada	Fortificado	Esperada		(TCA) Fortificada	Esperada			
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9		
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6		
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9		
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5		
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1		
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9		
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0		
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6		
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6		
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6		
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6		
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2		
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8		
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1		
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3		
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8		
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4		
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2		
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4		

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

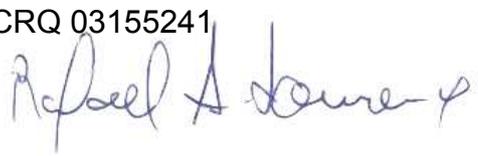
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	364/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	147BGC / 30680
Data de Coleta	20/07/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	147BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	137,8
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			137,8
Σ HPA			137,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			21,2
Lipídios (%)			23,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

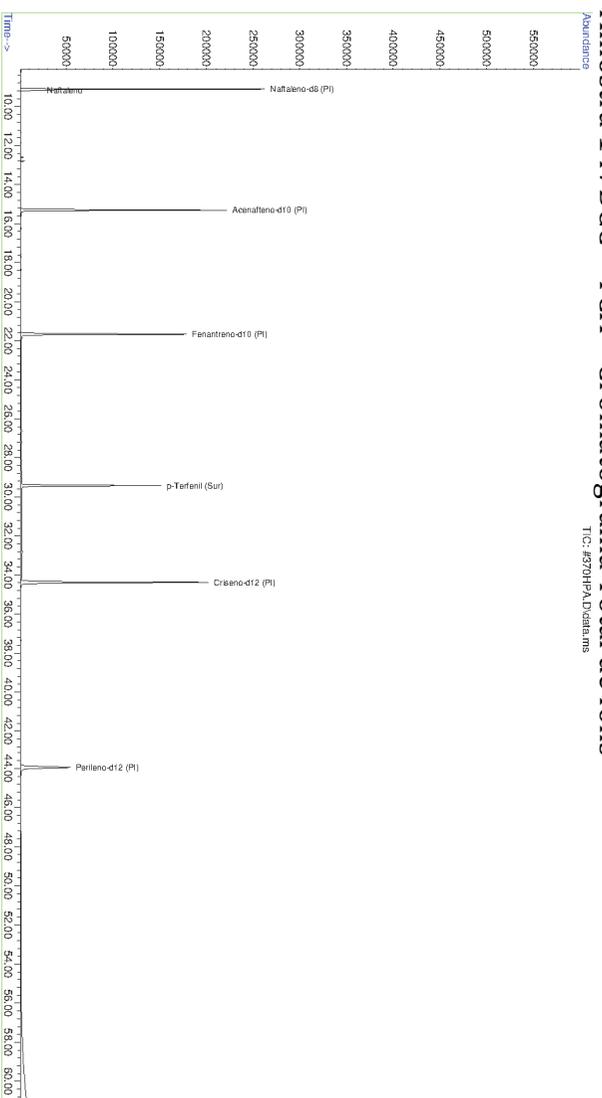
Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	147BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,4	174,8
2-Metilnaftaleno	0,8	11,4	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	11,4	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	11,4	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,4	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,4	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,4	<0,2
Acenafteno	0,2	11,4	<0,2
Fluoreno	0,1	11,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,4	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,4	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,4	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,4	<0,2
Fenantreno	0,4	11,4	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,4	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,4	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,4	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,4	<0,4
Antraceno	0,2	11,4	<0,2
Fluoranteno	0,2	11,4	<0,2
Pireno	0,2	11,4	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,4	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,4	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,4	<0,4
Criseno	0,4	11,4	<0,4
C1-Criseno	0,4	11,4	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,4	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,4	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,4	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	11,4	<0,1
Perileno	0,1	11,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			174,8
Σ HPA			174,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			21,2
Lipídios (%)			23,2

TCA = Amostra de Gordura

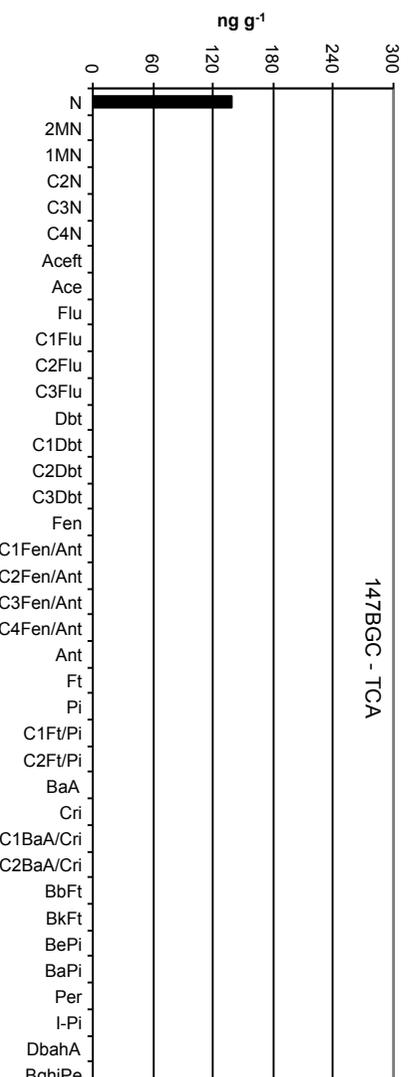
LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 147BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons

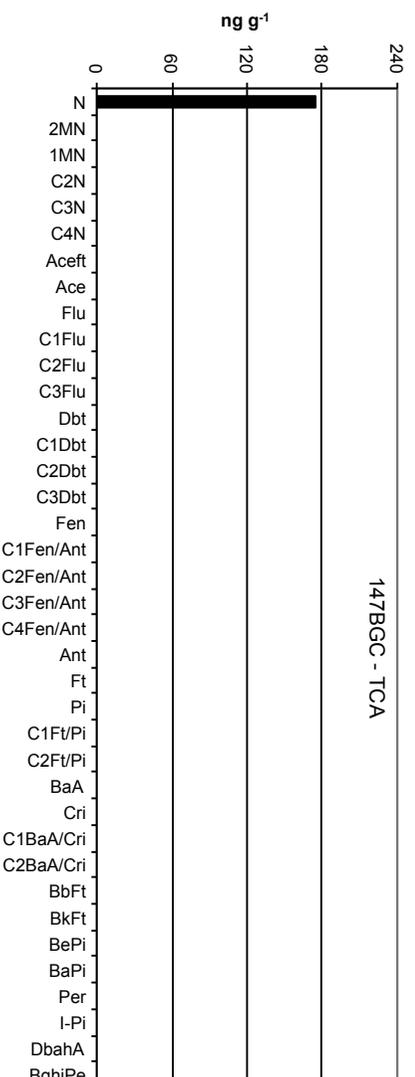
TIC: J82701FA.D\data.ms



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- $d_{12,0}$ e Perileno- $d_{12,0}$, concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 32792 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

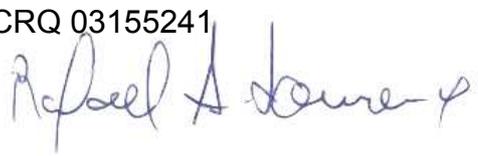
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	365/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	151BGC / 30698
Data de Coleta	23/07/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	151BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	562,5
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	10,2
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	9,4
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	79,0
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	31,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			672,7
Σ HPA			692,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			38,7
Lipídios (%)			10,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

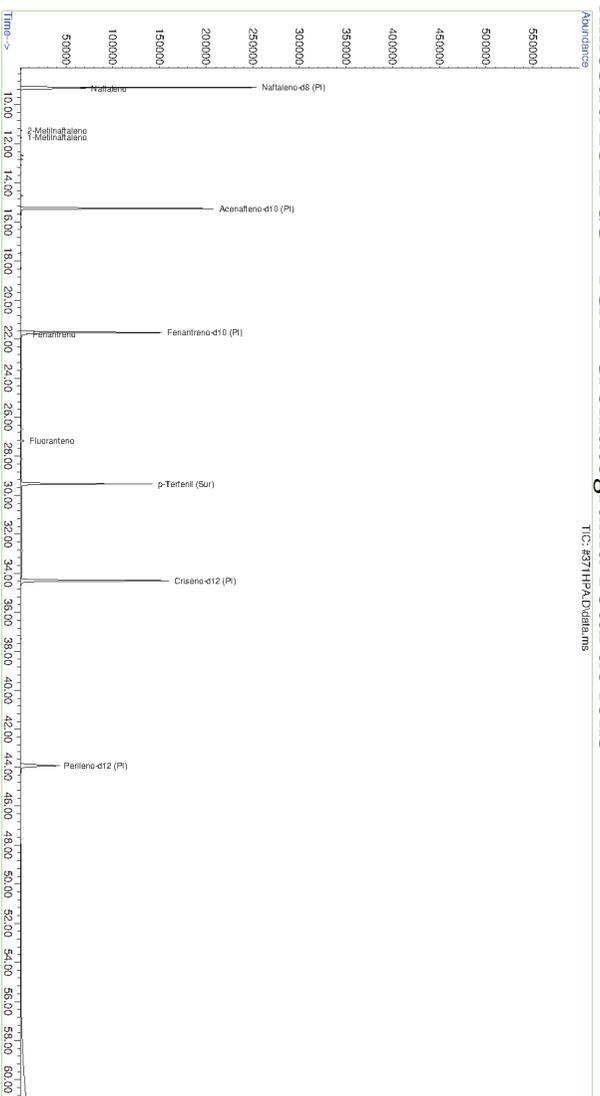
Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	151BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	14,7	917,5
2-Metilnaftaleno	1,0	14,7	16,6
1-Metilnaftaleno	1,0	14,7	15,3
C2-Naftaleno	1,0	14,7	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	14,7	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	14,7	<1,0
Acenaftileno	0,2	14,7	<0,2
Acenafteno	0,2	14,7	<0,2
Fluoreno	0,1	14,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	14,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,7	<0,3
Fenantreno	0,5	14,7	128,9
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,7	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,7	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,7	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,7	<0,5
Antraceno	0,2	14,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,7	50,9
Pireno	0,2	14,7	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,7	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,7	<0,5
Criseno	0,5	14,7	<0,5
C1-Criseno	0,5	14,7	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,7	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	14,7	<0,1
Perileno	0,1	14,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,7	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			1097,4
Σ HPA			1129,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			38,7
Lipídios (%)			10,8

TCA = Amostra de Gordura

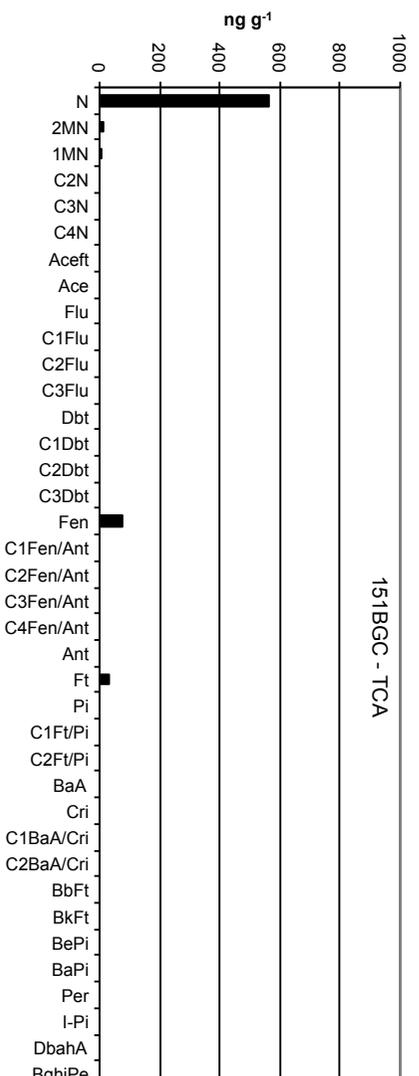
LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

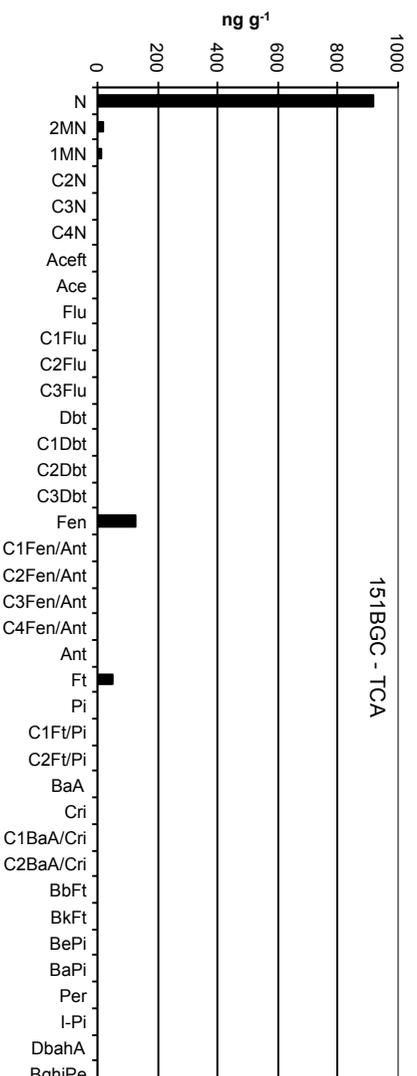
Amostra 151BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- $d_{12,0}$ e Perileno- $d_{12,0}$, concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 32792 (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralichthys brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. Marine Pollution Bulletin., v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality, NOAA, Silver Spring, 1994.

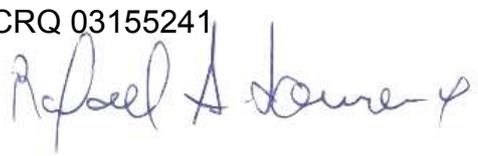
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	366/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	168BGC / 30765
Data de Coleta	02/08/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	06/02/2018 a 07/03/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	20/03/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	168BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	98,9
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	9,2
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<9,0
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	41,7
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	104,4
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	63,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	80,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	97,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	35,0
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	38,5
Pireno	0,1	9,0	27,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ 16 HPA Prioritários			237,1
Σ HPA			596,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			48,3
Lipídios (%)			8,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

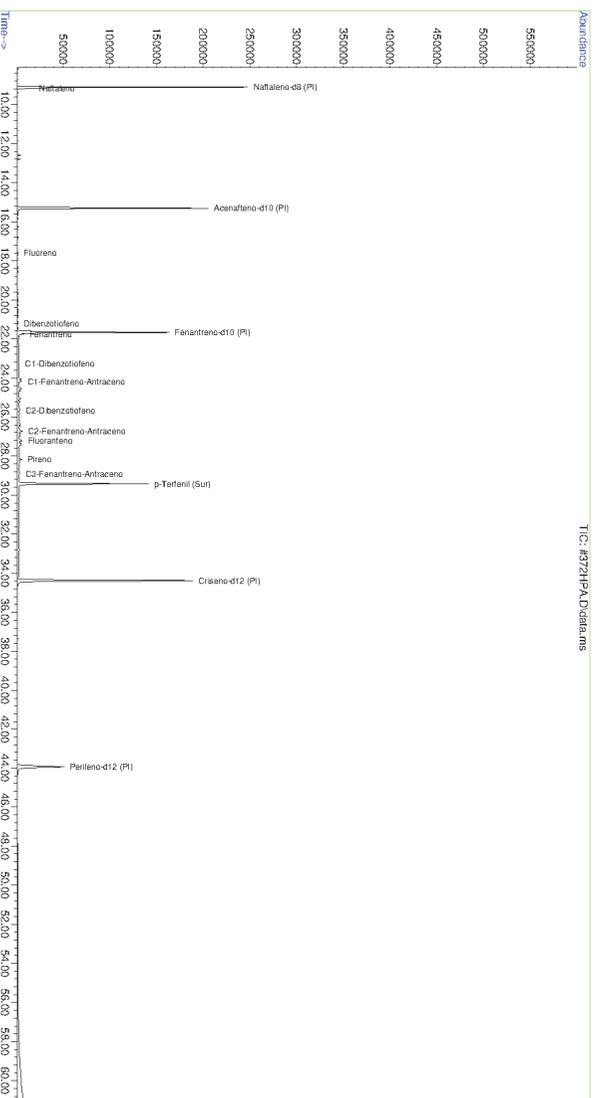
Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Código da Biópsia (SisPMC)/Tecido	168BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,2	17,4	191,3
2-Metilnaftaleno	1,2	17,4	<1,2
1-Metilnaftaleno	1,2	17,4	<1,2
C2-Naftaleno	1,2	17,4	<1,2
C3-Naftaleno	1,2	17,4	<1,2
C4-Naftaleno	1,2	17,4	<1,2
Acenaftileno	0,2	17,4	<0,2
Acenafteno	0,2	17,4	<0,2
Fluoreno	0,1	17,4	17,7
C1-Fluoreno	0,1	17,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	17,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	17,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	17,4	<17,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	17,4	80,6
C2-Dibenzotiofeno	0,4	17,4	201,9
C3-Dibenzotiofeno	0,4	17,4	<0,4
Fenantreno	0,6	17,4	122,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	17,4	155,9
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	17,4	188,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	17,4	67,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	17,4	<0,6
Antraceno	0,2	17,4	<0,2
Fluoranteno	0,3	17,4	74,5
Pireno	0,2	17,4	52,5
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	17,4	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	17,4	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	17,4	<0,6
Criseno	0,6	17,4	<0,6
C1-Criseno	0,6	17,4	<0,6
C2-Criseno	0,6	17,4	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	17,4	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	17,4	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	17,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	17,4	<0,1
Perileno	0,1	17,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	17,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	17,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	17,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			458,5
Σ HPA			1152,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			48,3
Lipídios (%)			8,4

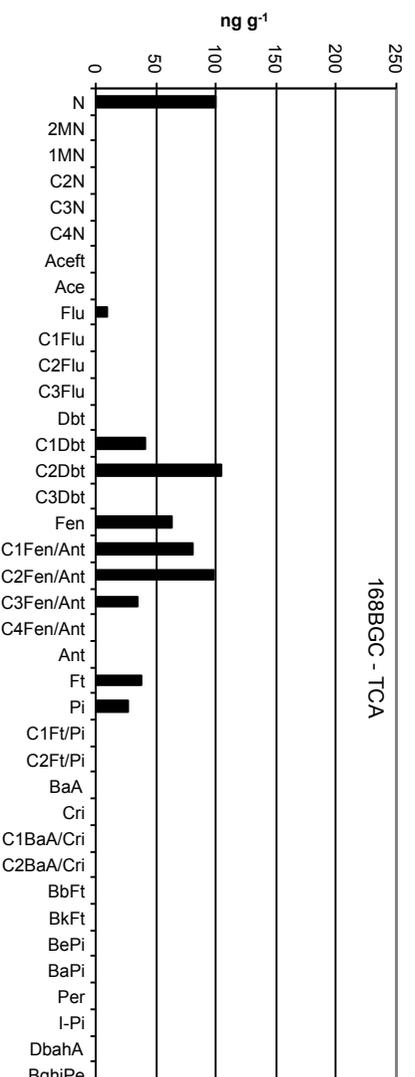
TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

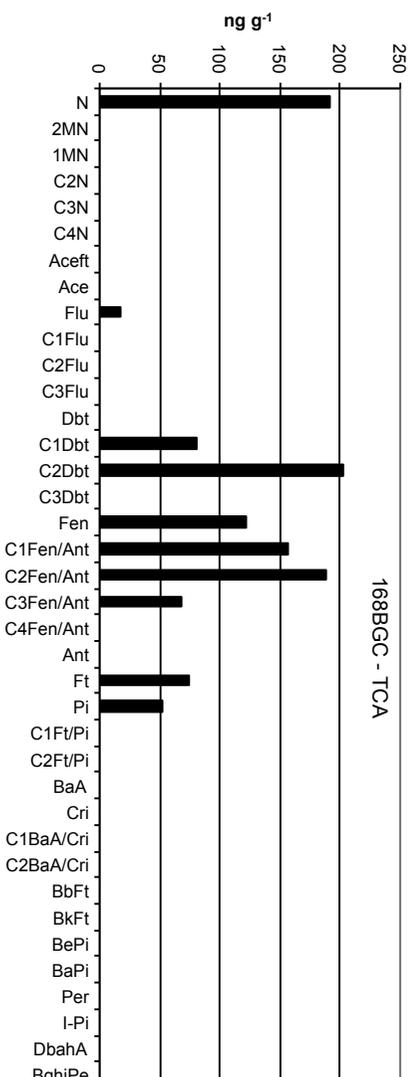
Amostra 168BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- $d_{12,0}$ e Perileno- $d_{12,0}$, concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco		Concentração		Recuperação (%)	Amostra 32792		Concentração		Recuperação (%)
	Análítico	Esperada	Fortificado	Esperada		(TCA) Fortificada	Esperada			
Naftaleno	<0,6	<0,6	31,0	50,0	62,0	34,0	50,0	67,9		
Acenaftileno	<0,1	<0,1	35,6	50,0	71,2	35,8	50,0	71,6		
Acenafteno	<0,1	<0,1	35,2	50,0	70,4	28,5	50,0	56,9		
Fluoreno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	29,2	50,0	58,5		
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	34,8	50,0	69,6	29,5	50,0	59,1		
Fenantreno	<0,3	<0,3	41,6	50,0	83,1	45,4	50,0	90,9		
Antraceno	<0,1	<0,1	40,4	50,0	80,9	34,0	50,0	68,0		
Fluoranteno	<0,2	<0,2	42,5	50,0	85,0	40,8	50,0	81,6		
Pireno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,0	36,3	50,0	72,6		
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	44,5	50,0	89,1	39,3	50,0	78,6		
Criseno	<0,3	<0,3	45,8	50,0	91,5	41,3	50,0	82,6		
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,9	50,0	85,7	39,6	50,0	79,2		
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	40,9	50,0	81,7	31,9	50,0	63,8		
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	41,9	50,0	83,7	33,5	50,0	67,1		
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	39,9	50,0	79,8	32,7	50,0	65,3		
Perileno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	43,4	50,0	86,8		
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	48,0	50,0	96,0	35,2	50,0	70,4		
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,7	38,1	50,0	76,2		
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,0	50,0	72,0	37,2	50,0	74,4		

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 016.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralichthys brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

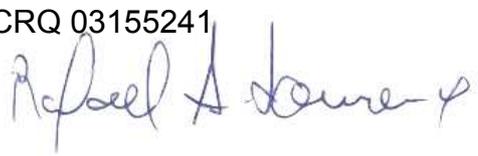
Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

**Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Projeto de Monitoramento de Cetáceos**

Número do laudo	431/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13) 32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11) 30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SisPMC)/Código do Avistamento	052BGC / 30765
Data de Coleta	10/08/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ Líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/03/2018 a 16/04/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	23/04/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC) /Tecido	BGC052		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			59
Umidade (%)			27,2
Lipídios (%)			34,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

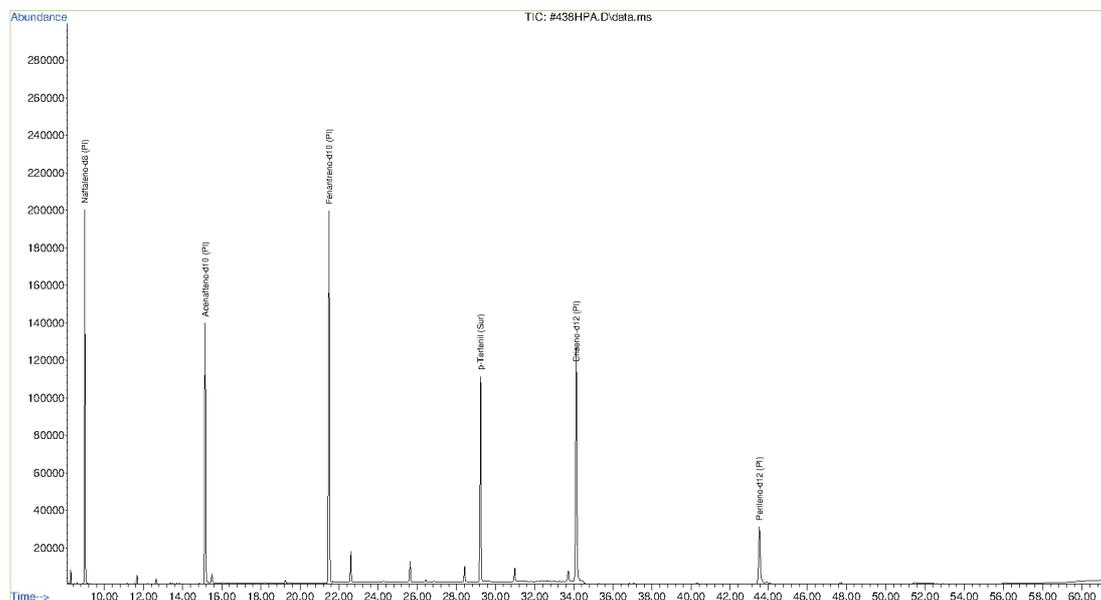
Biópsia (SiSPMC) /Tecido	BGC052		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,4	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,4	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,4	<0,2
Acenafteno	0,2	12,4	<0,2
Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
Fenantreno	0,4	12,4	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
Antraceno	0,2	12,4	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Pireno	0,2	12,4	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,4	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,4	<0,4
Criseno	0,4	12,4	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,4	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,4	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,4	<0,1
Perileno	0,1	12,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			59
Umidade (%)			27,2
Lipídios (%)			34,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método
LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 052BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



* os picos não identificados no cromatograma não correspondem aos HPAs.

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)
Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 55597 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	29,9	50,0	59,8	29,4	50,0	58,8
Acenafileno	<0,1	<0,1	24,8	50,0	49,6	27,1	50,0	54,1
Acenafeno	<0,1	<0,1	31,2	50,0	62,4	35,8	50,0	71,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	33,7	50,0	67,5
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	35,4	50,0	70,8	39,6	50,0	79,3
Fenantreno	<0,3	<0,3	40,4	50,0	80,8	29,2	50,0	58,4
Antraceno	<0,1	<0,1	40,2	50,0	80,4	32,2	50,0	64,3
Fluoranteno	<0,2	<0,2	40,1	50,0	80,2	33,0	50,0	66,1
Pireno	<0,1	<0,1	22,3	50,0	44,7	38,3	50,0	76,6
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	37,7	50,0	75,4	31,5	50,0	62,9
Criseno	<0,3	<0,3	34,9	50,0	69,8	27,3	50,0	54,7
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	27,8	50,0	55,5	36,2	50,0	72,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	39,2	50,0	78,4	32,0	50,0	63,9
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	31,0	50,0	62,0	36,9	50,0	73,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	33,9	50,0	67,7	34,7	50,0	69,4
Perileno	<0,1	<0,1	39,1	50,0	78,3	27,8	50,0	55,6
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	38,4	50,0	76,8	32,6	50,0	65,2
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	38,3	50,0	76,7	33,3	50,0	66,6
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	31,3	50,0	62,6	30,9	50,0	61,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 16/01/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 020.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralorchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

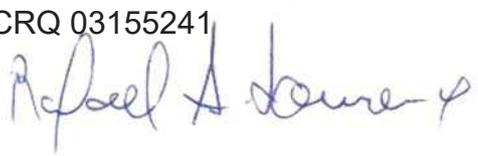


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	622/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	178BGC / 31308 – <i>S. frontalis</i>
Data de Coleta	02/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC178		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			71
Umidade (%)			57,4
Lipídios (%)			6,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC178		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
2-Metilnaftaleno	1,4	21,1	<1,4
1-Metilnaftaleno	1,4	21,1	<1,4
C2-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
C3-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
C4-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
Acenaftileno	0,3	21,1	<0,3
Acenafteno	0,3	21,1	<0,3
Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
Fenantreno	0,7	21,1	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
Antraceno	0,3	21,1	<0,3
Fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Pireno	0,3	21,1	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	21,1	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	21,1	<0,7
Criseno	0,7	21,1	<0,7
C1-Criseno	0,7	21,1	<0,7
C2-Criseno	0,7	21,1	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	21,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	21,1	<0,1
Perileno	0,1	21,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	21,1	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	21,1	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	21,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			71
Umidade (%)			57,4
Lipídios (%)			6,0

TCA = Amostra de Gordura

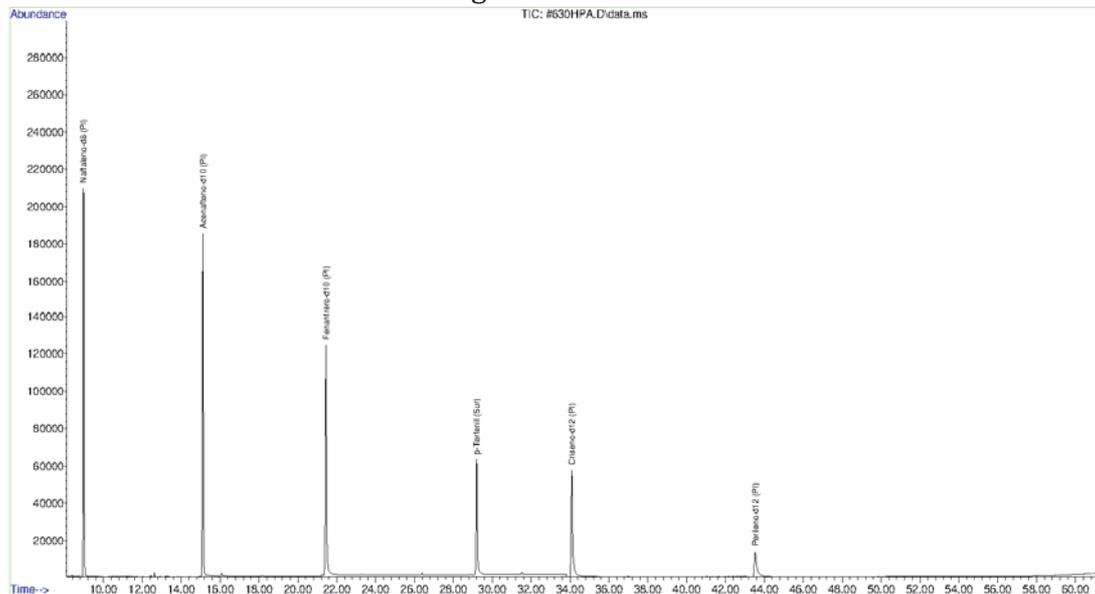
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Amostra 178BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

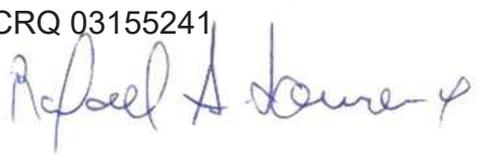


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	623/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	184BGC / 31372 – <i>M. novaeangliae</i>
Data de Coleta	11/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC184		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	10,8
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			10,8
Σ HPA			10,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			88
Umidade (%)			34,2
Lipídios (%)			27,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

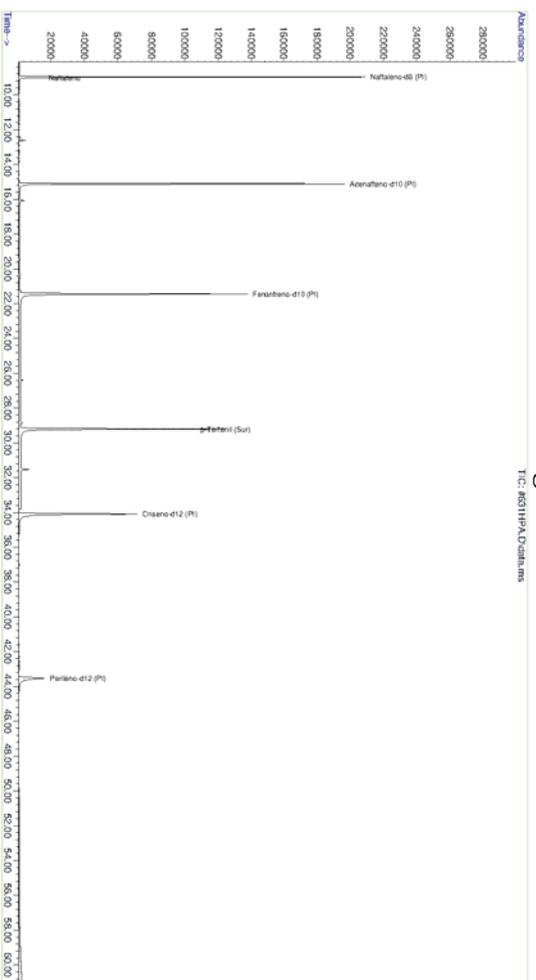
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC184		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,7	16,4
2-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,7	<0,2
Acenafteno	0,2	13,7	<0,2
Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
Fenantreno	0,5	13,7	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
Antraceno	0,2	13,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Pireno	0,2	13,7	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	13,7	<0,5
Criseno	0,5	13,7	<0,5
C1-Criseno	0,5	13,7	<0,5
C2-Criseno	0,5	13,7	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,7	<0,1
Perileno	0,1	13,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			16,4
Σ HPA			16,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			88
Umidade (%)			34,2
Lipídios (%)			27,6

TCA = Amostra de Gordura

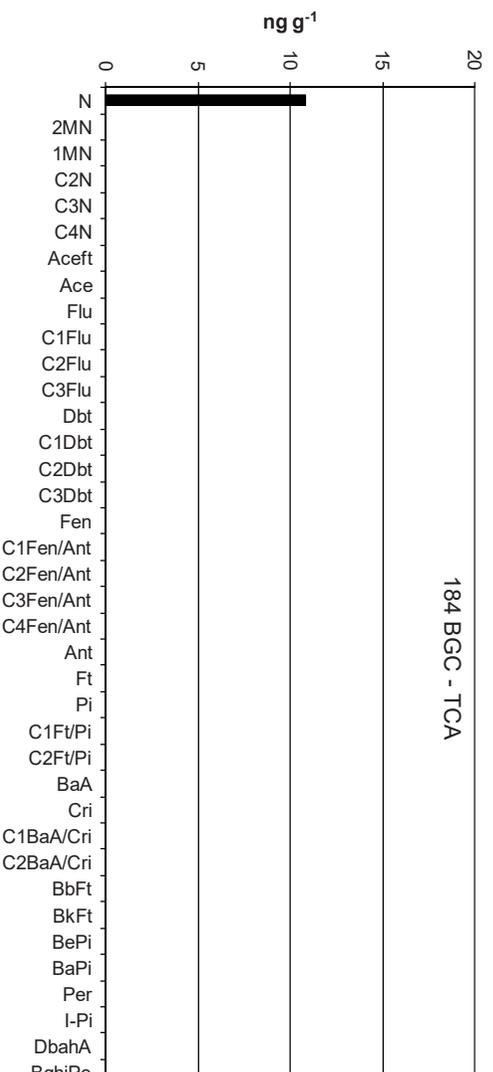
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

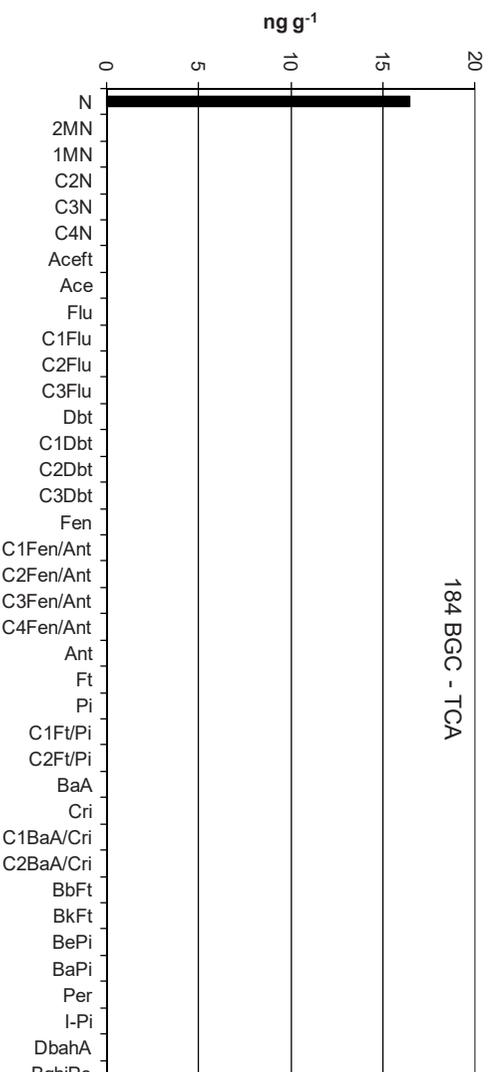
Amostra 184BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícigo, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bícigo, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

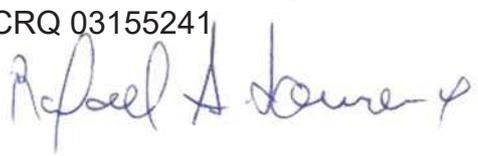


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	624/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	185BGC / 31379 - <i>M. novaeangliae</i>
Data de Coleta	12/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC185		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			69
Umidade (%)			26,3
Lipídios (%)			25,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

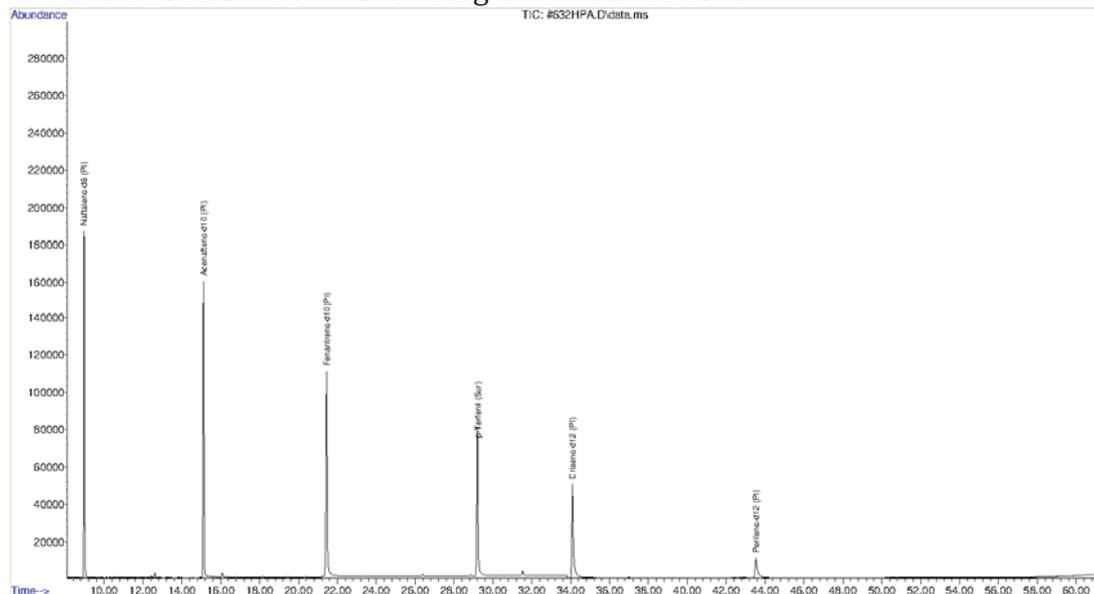
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC185		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,2	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,2	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,2	<0,2
Acenafteno	0,2	12,2	<0,2
Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
Fenantreno	0,4	12,2	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
Antraceno	0,2	12,2	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Pireno	0,2	12,2	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,2	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,2	<0,4
Criseno	0,4	12,2	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,2	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,2	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,2	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,2	<0,1
Perileno	0,1	12,2	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,2	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,2	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			69
Umidade (%)			26,3
Lipídios (%)			25,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 185BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafeno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

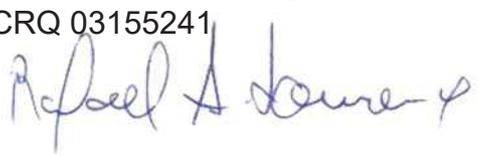


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	625/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	186BGC / 31379 - <i>M. novaeangliae</i>
Data de Coleta	12/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC186		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			83
Umidade (%)			26,8
Lipídios (%)			24,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

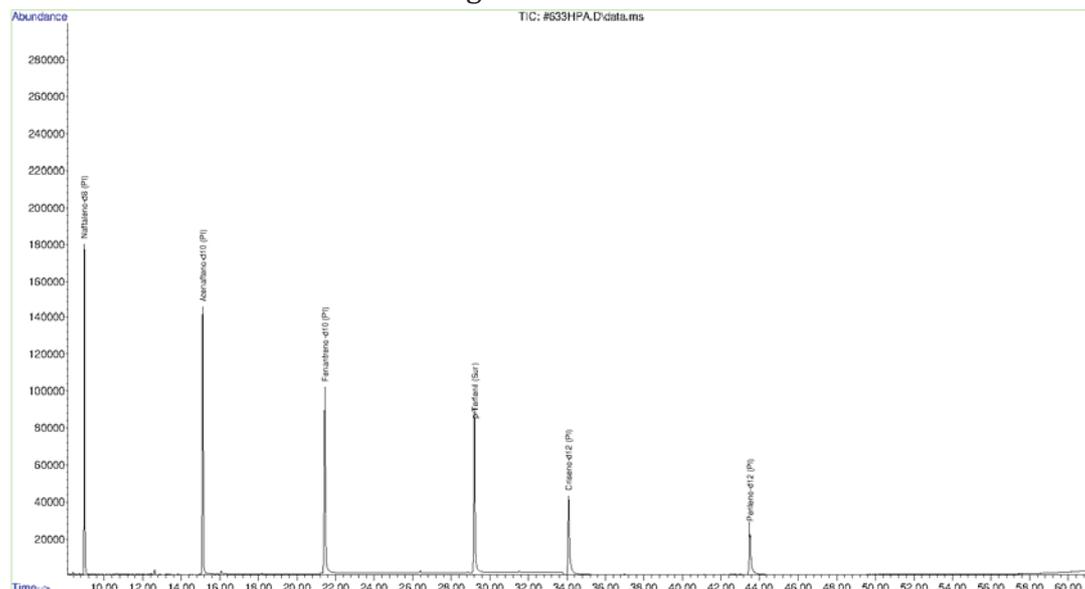
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC186		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,3	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,3	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,3	<0,2
Acenafteno	0,2	12,3	<0,2
Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
Fenantreno	0,4	12,3	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
Antraceno	0,2	12,3	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Pireno	0,2	12,3	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,3	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,3	<0,4
Criseno	0,4	12,3	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,3	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,3	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,3	<0,1
Perileno	0,1	12,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			83
Umidade (%)			26,8
Lipídios (%)			24,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 186BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícigo, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

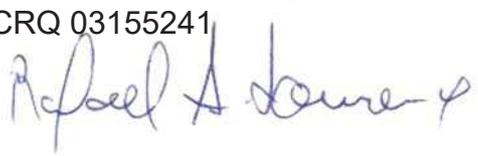


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	626/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	187BGC / 31385 – <i>B. brydei</i>
Data de Coleta	13/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC187		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			37,3
Lipídios (%)			22,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

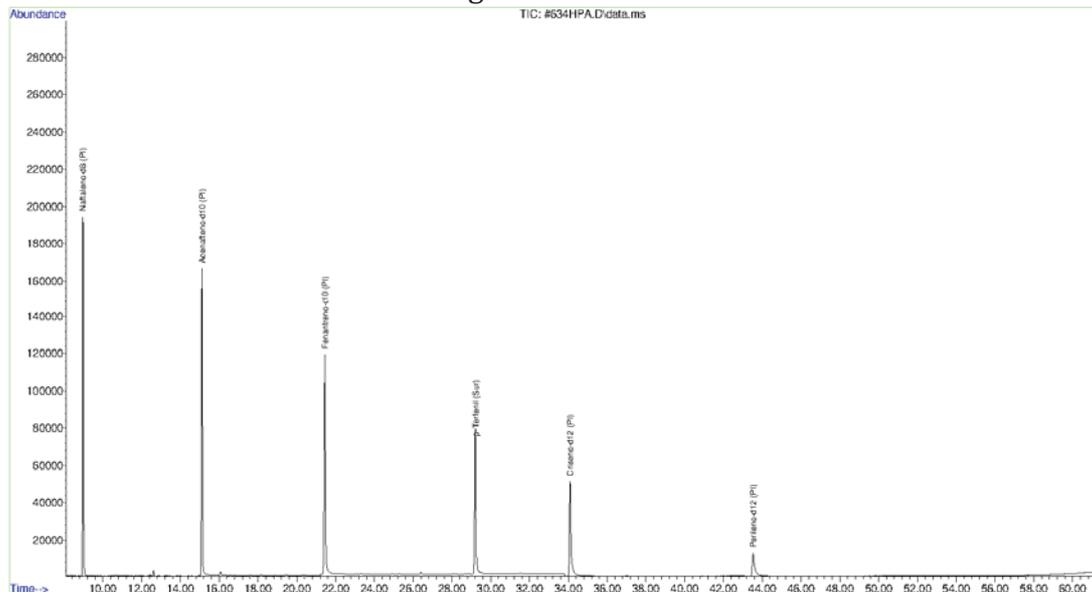
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC187		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	14,3	<1,0
2-Metilnaftaleno	1,0	14,3	<1,0
1-Metilnaftaleno	1,0	14,3	<1,0
C2-Naftaleno	1,0	14,3	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	14,3	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	14,3	<1,0
Acenaftileno	0,2	14,3	<0,2
Acenafteno	0,2	14,3	<0,2
Fluoreno	0,1	14,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	14,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,3	<0,3
Fenantreno	0,5	14,3	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,3	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,3	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,3	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,3	<0,5
Antraceno	0,2	14,3	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,3	<0,3
Pireno	0,2	14,3	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,3	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,3	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,3	<0,5
Criseno	0,5	14,3	<0,5
C1-Criseno	0,5	14,3	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,3	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,3	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,3	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	14,3	<0,1
Perileno	0,1	14,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			37,3
Lipídios (%)			22,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 187BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

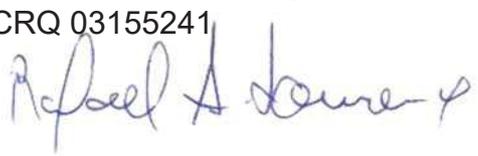


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	627/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	191BGC / 31402 – <i>P. macrocephalus</i>
Data de Coleta	15/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC191		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<9
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			89
Umidade (%)			59,0
Lipídios (%)			4,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

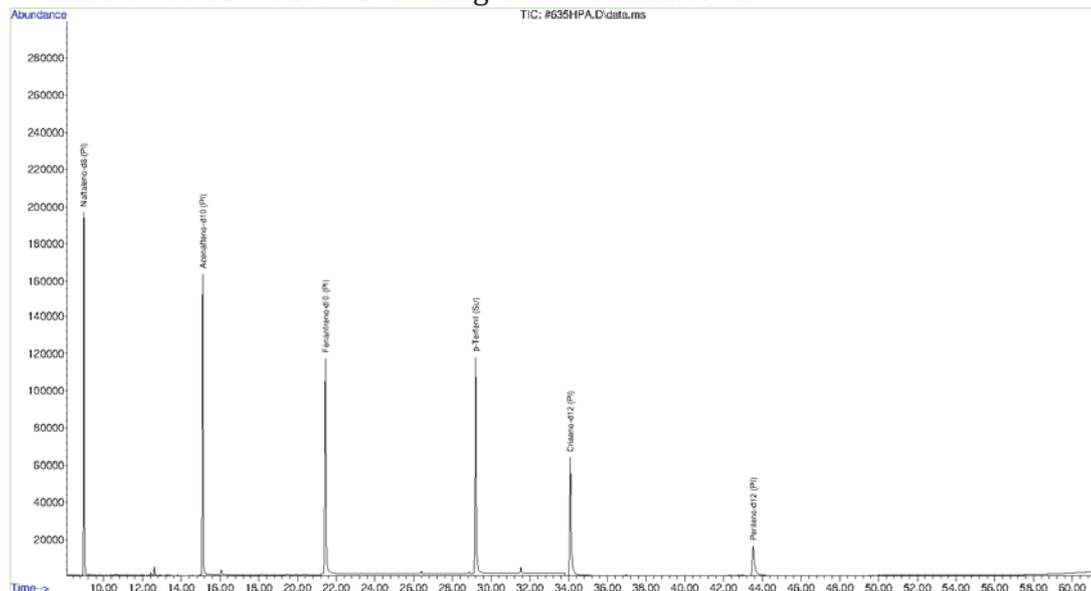
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC191		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,5	22,0	<1,5
2-Metilnaftaleno	1,5	22,0	<1,5
1-Metilnaftaleno	1,5	22,0	<1,5
C2-Naftaleno	1,5	22,0	<1,5
C3-Naftaleno	1,5	22,0	<1,5
C4-Naftaleno	1,5	22,0	<1,5
Acenaftileno	0,3	22,0	<0,3
Acenafteno	0,3	22,0	<0,3
Fluoreno	0,1	22,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	22,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	22,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	22,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,5	22,0	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	22,0	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	22,0	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	22,0	<0,5
Fenantreno	0,7	22,0	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	22,0	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	22,0	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	22,0	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	22,0	<0,7
Antraceno	0,3	22,0	<0,3
Fluoranteno	0,4	22,0	<0,4
Pireno	0,3	22,0	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	22,0	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	22,0	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	22,0	<0,7
Criseno	0,7	22,0	<0,7
C1-Criseno	0,7	22,0	<0,7
C2-Criseno	0,7	22,0	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	22,0	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	22,0	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	22,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	22,0	<0,1
Perileno	0,1	22,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	22,0	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	22,0	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	22,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			89
Umidade (%)			59,0
Lipídios (%)			4,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 191BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícago, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

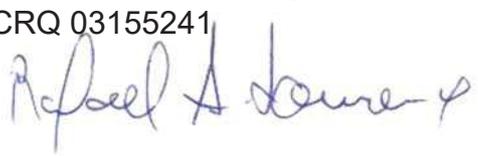


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	628/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	200BGC / 31435 – <i>S. frontalis</i>
Data de Coleta	18/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC200		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	16,5
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			16,5
Σ HPA			16,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			62,5
Lipídios (%)			10,8

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

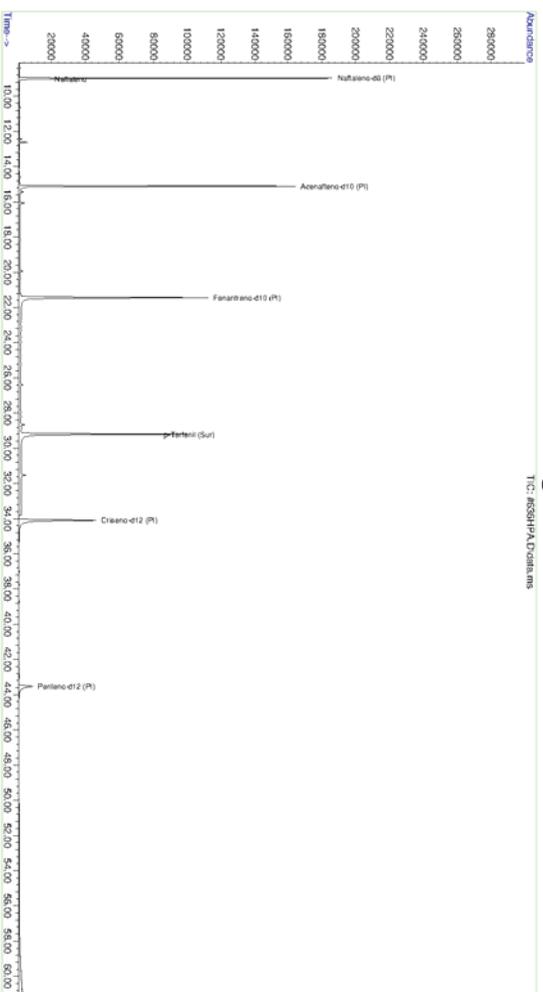
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC200		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,6	24,0	44,1
2-Metilnaftaleno	1,6	24,0	<1,6
1-Metilnaftaleno	1,6	24,0	<1,6
C2-Naftaleno	1,6	24,0	<1,6
C3-Naftaleno	1,6	24,0	<1,6
C4-Naftaleno	1,6	24,0	<1,6
Acenaftileno	0,3	24,0	<0,3
Acenafteno	0,3	24,0	<0,3
Fluoreno	0,2	24,0	<0,2
C1-Fluoreno	0,2	24,0	<0,2
C2-Fluoreno	0,2	24,0	<0,2
C3-Fluoreno	0,2	24,0	<0,2
Dibenzotiofeno	0,5	24,0	<0,5
C1-Dibenzotiofeno	0,5	24,0	<0,5
C2-Dibenzotiofeno	0,5	24,0	<0,5
C3-Dibenzotiofeno	0,5	24,0	<0,5
Fenantreno	0,8	24,0	<0,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,8	24,0	<0,8
C2-Fenantreno-antraceno	0,8	24,0	<0,8
C3-Fenantreno-antraceno	0,8	24,0	<0,8
C4-Fenantreno-antraceno	0,8	24,0	<0,8
Antraceno	0,3	24,0	<0,3
Fluoranteno	0,5	24,0	<0,5
Pireno	0,3	24,0	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,5	24,0	<0,5
C2-Fluoranteno-pireno	0,5	24,0	<0,5
Benzo(a)antraceno	0,8	24,0	<0,8
Criseno	0,8	24,0	<0,8
C1-Criseno	0,8	24,0	<0,8
C2-Criseno	0,8	24,0	<0,8
Benzo(b)fluoranteno	0,5	24,0	<0,5
Benzo(k)fluoranteno	0,5	24,0	<0,5
Benzo(e)pireno	0,2	24,0	<0,2
Benzo(a)pireno	0,2	24,0	<0,2
Perileno	0,2	24,0	<0,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	24,0	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	24,0	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,2	24,0	<0,2
Σ16 HPA Prioritários			44,1
Σ HPA			44,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			62,5
Lipídios (%)			10,8

TCA = Amostra de Gordura

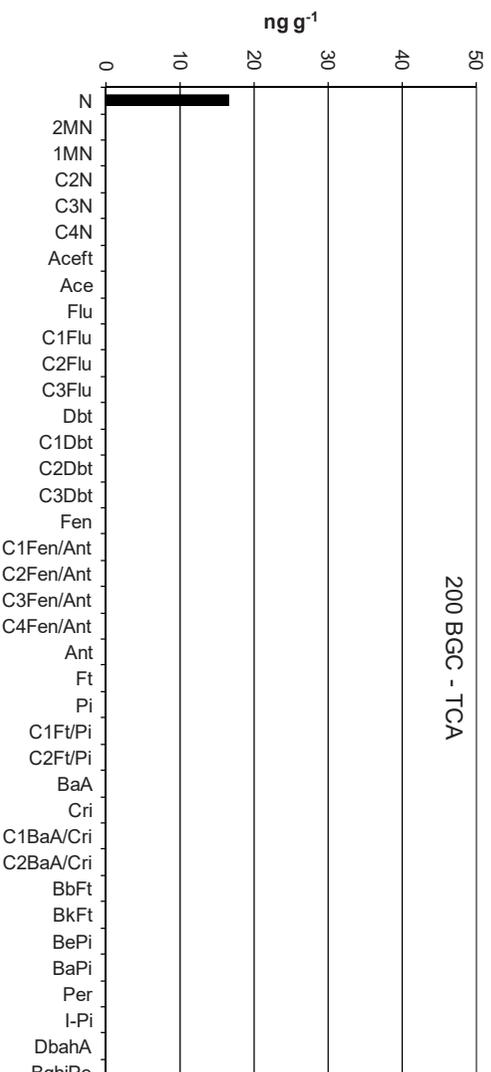
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

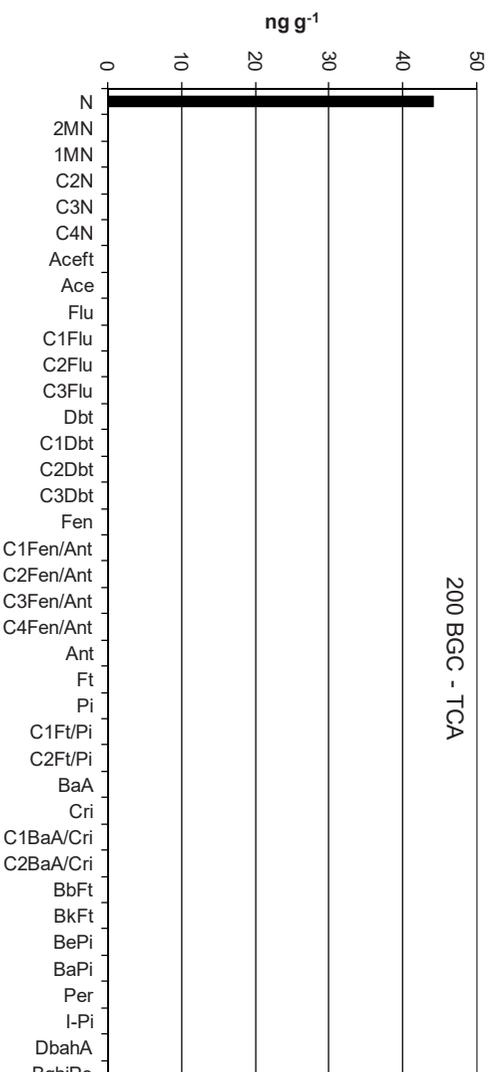
Amostra 200BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

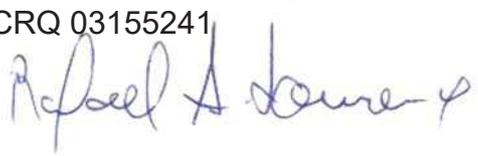


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	629/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	214BGC / 32588 – <i>S. frontalis</i>
Data de Coleta	04/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC214		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			79
Umidade (%)			48,5
Lipídios (%)			10,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

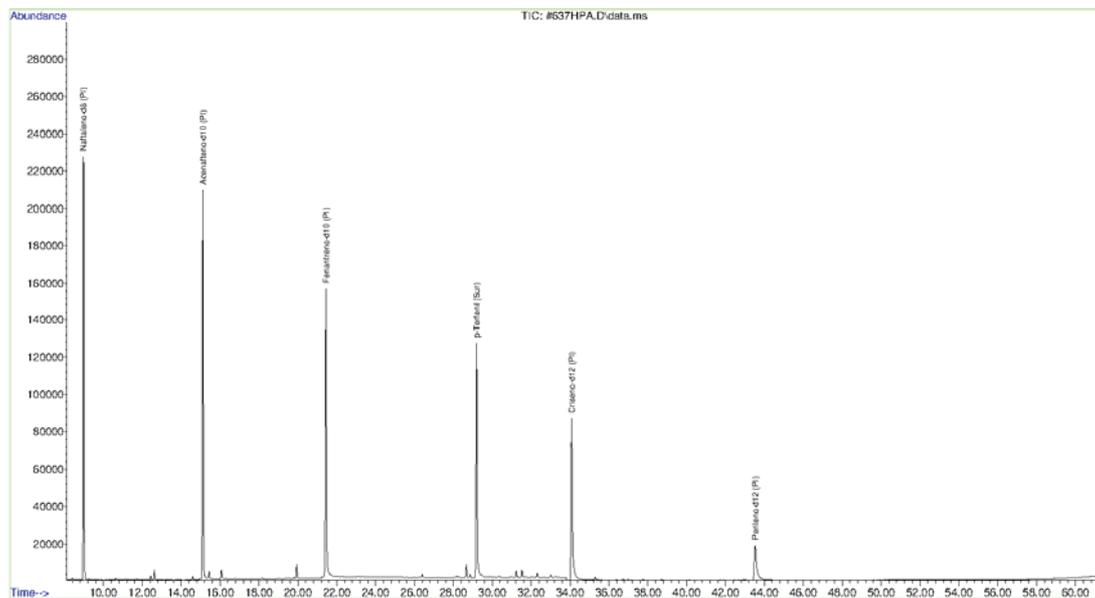
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC214		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,2	17,5	<1,2
2-Metilnaftaleno	1,2	17,5	<1,2
1-Metilnaftaleno	1,2	17,5	<1,2
C2-Naftaleno	1,2	17,5	<1,2
C3-Naftaleno	1,2	17,5	<1,2
C4-Naftaleno	1,2	17,5	<1,2
Acenaftileno	0,2	17,5	<0,2
Acenafteno	0,2	17,5	<0,2
Fluoreno	0,1	17,5	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	17,5	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	17,5	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	17,5	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	17,5	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	17,5	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	17,5	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	17,5	<0,4
Fenantreno	0,6	17,5	<0,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	17,5	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	17,5	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	17,5	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	17,5	<0,6
Antraceno	0,2	17,5	<0,2
Fluoranteno	0,3	17,5	<0,3
Pireno	0,2	17,5	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	17,5	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	17,5	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	17,5	<0,6
Criseno	0,6	17,5	<0,6
C1-Criseno	0,6	17,5	<0,6
C2-Criseno	0,6	17,5	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	17,5	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	17,5	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	17,5	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	17,5	<0,1
Perileno	0,1	17,5	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	17,5	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	17,5	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	17,5	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			79
Umidade (%)			48,5
Lipídios (%)			10,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 214BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícigo, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

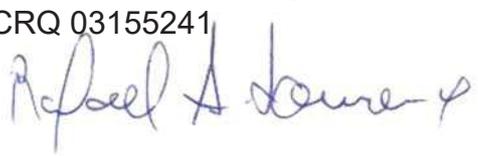


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	630/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	238BGC / 32770 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	30/03/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC238		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	17,5
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			17,5
Σ HPA			17,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			95
Umidade (%)			50,4
Lipídios (%)			18,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

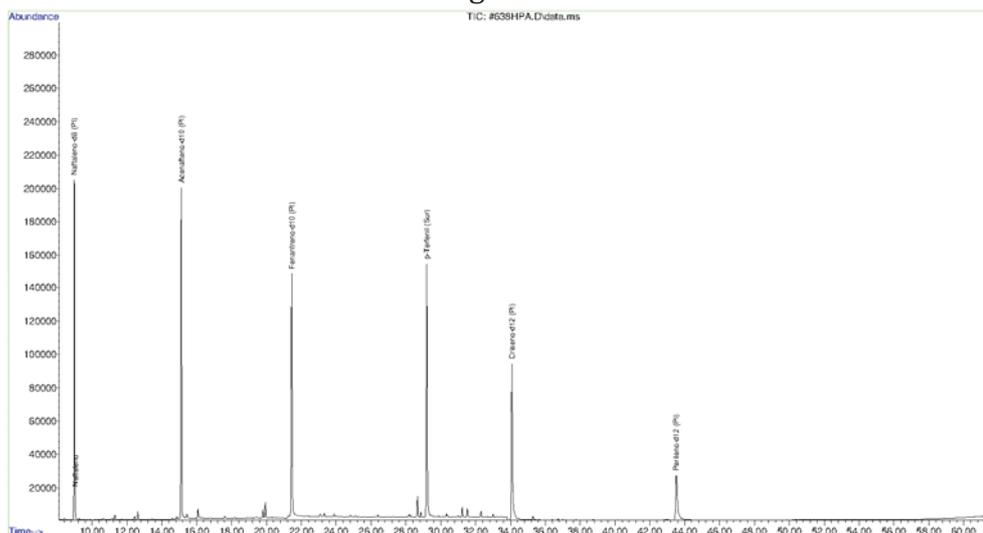
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC238		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,2	18,1	35,2
2-Metilnaftaleno	1,2	18,1	<1,2
1-Metilnaftaleno	1,2	18,1	<1,2
C2-Naftaleno	1,2	18,1	<1,2
C3-Naftaleno	1,2	18,1	<1,2
C4-Naftaleno	1,2	18,1	<1,2
Acenaftileno	0,2	18,1	<0,2
Acenafteno	0,2	18,1	<0,2
Fluoreno	0,1	18,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	18,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	18,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	18,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	18,1	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	18,1	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	18,1	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	18,1	<0,4
Fenantreno	0,6	18,1	<0,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	18,1	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	18,1	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	18,1	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	18,1	<0,6
Antraceno	0,2	18,1	<0,2
Fluoranteno	0,4	18,1	<0,4
Pireno	0,2	18,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	18,1	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	18,1	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,6	18,1	<0,6
Criseno	0,6	18,1	<0,6
C1-Criseno	0,6	18,1	<0,6
C2-Criseno	0,6	18,1	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,4	18,1	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	18,1	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	18,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	18,1	<0,1
Perileno	0,1	18,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	18,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	18,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	18,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			35,2
Σ HPA			35,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			95
Umidade (%)			50,4
Lipídios (%)			18,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

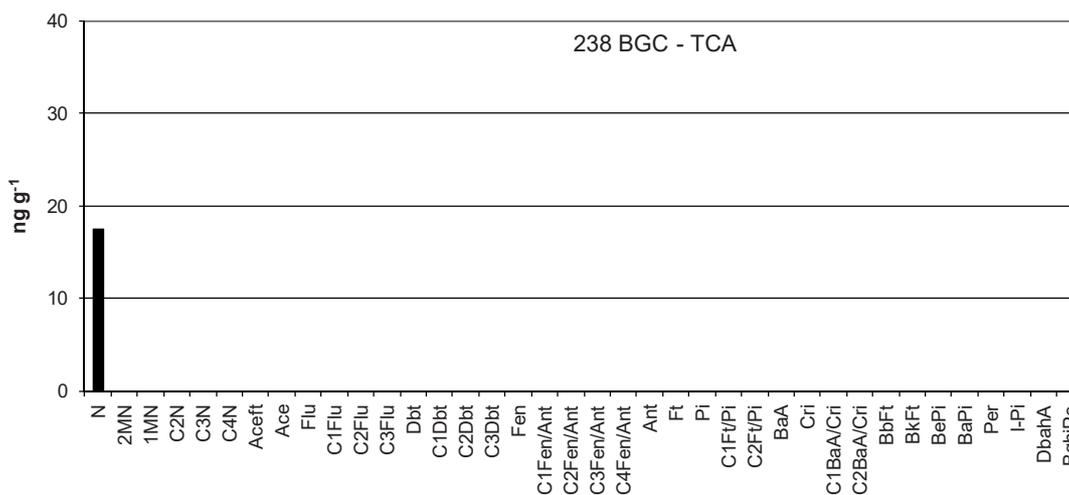
LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 238BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons

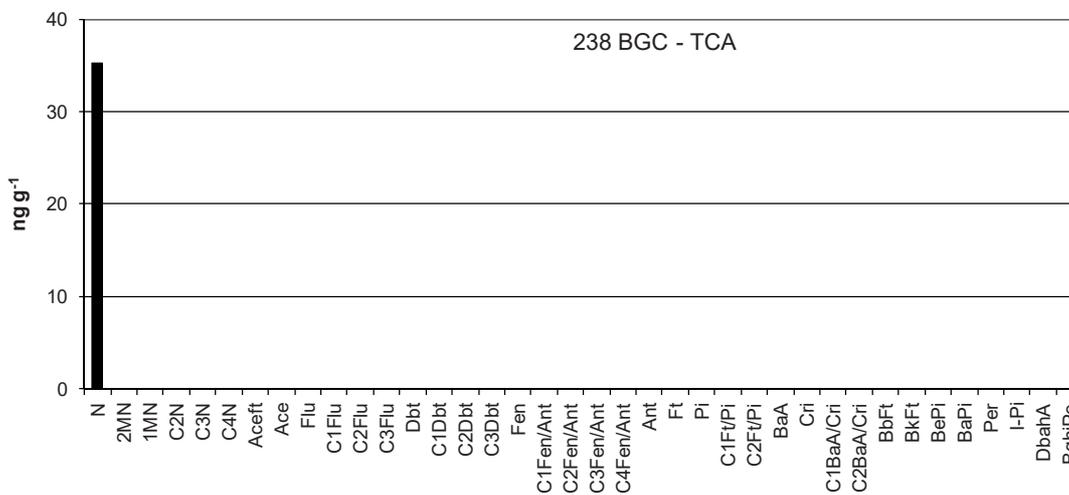


*os picos não identificados no cromatograma não correspondem aos HPAs

Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

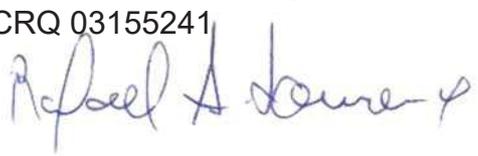


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	631/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	239BGC / 32784 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	02/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC239		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	16,7
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			16,7
Σ HPA			16,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			92
Umidade (%)			57,3
Lipídios (%)			7,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

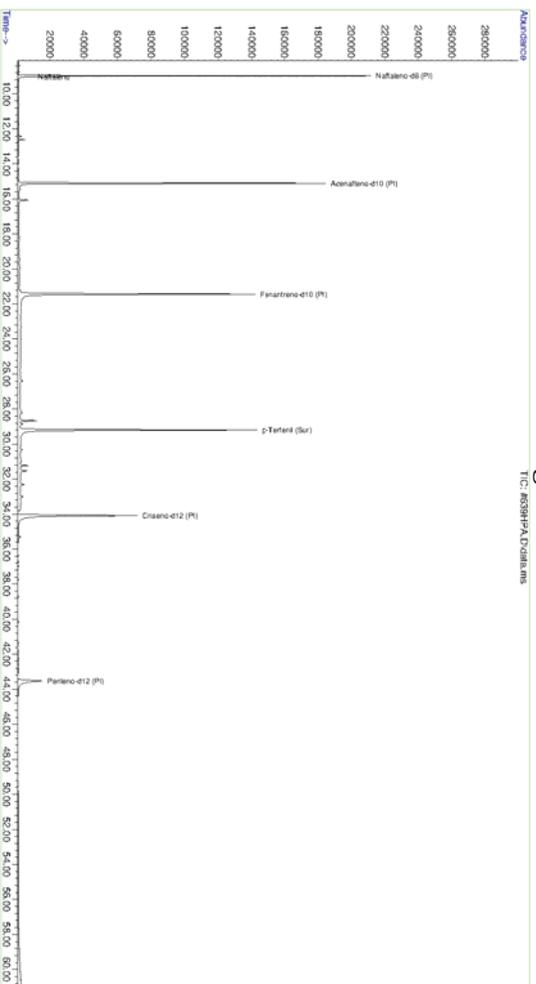
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC239		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,4	21,1	39,1
2-Metilnaftaleno	1,4	21,1	<1,4
1-Metilnaftaleno	1,4	21,1	<1,4
C2-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
C3-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
C4-Naftaleno	1,4	21,1	<1,4
Acenaftileno	0,3	21,1	<0,3
Acenafteno	0,3	21,1	<0,3
Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	21,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	21,1	<0,4
Fenantreno	0,7	21,1	<0,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C3-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
C4-Fenantreno-antraceno	0,7	21,1	<0,7
Antraceno	0,3	21,1	<0,3
Fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Pireno	0,3	21,1	<0,3
C1-Fluoranteno-pireno	0,4	21,1	<0,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(a)antraceno	0,7	21,1	<0,7
Criseno	0,7	21,1	<0,7
C1-Criseno	0,7	21,1	<0,7
C2-Criseno	0,7	21,1	<0,7
Benzo(b)fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(k)fluoranteno	0,4	21,1	<0,4
Benzo(e)pireno	0,1	21,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	21,1	<0,1
Perileno	0,1	21,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,3	21,1	<0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3	21,1	<0,3
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	21,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			39,1
Σ HPA			39,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			92
Umidade (%)			57,3
Lipídios (%)			7,6

TCA = Amostra de Gordura

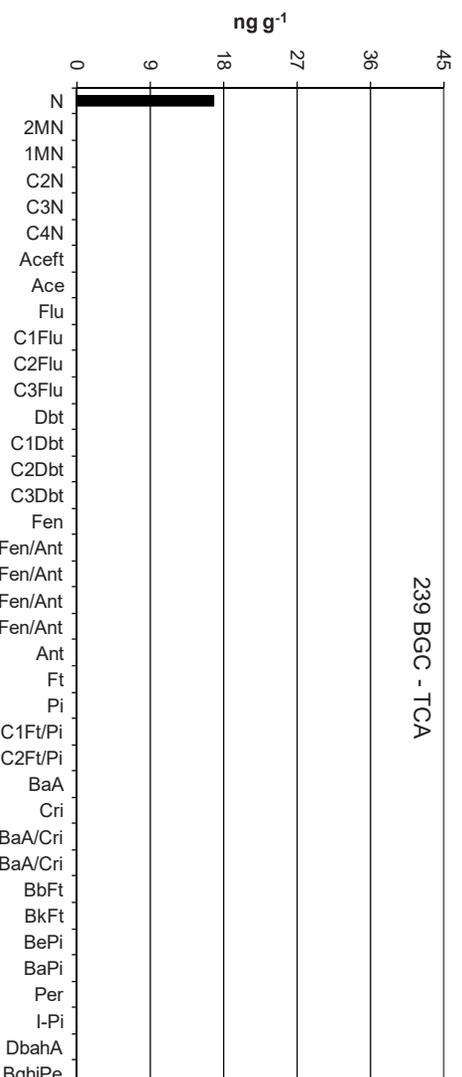
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

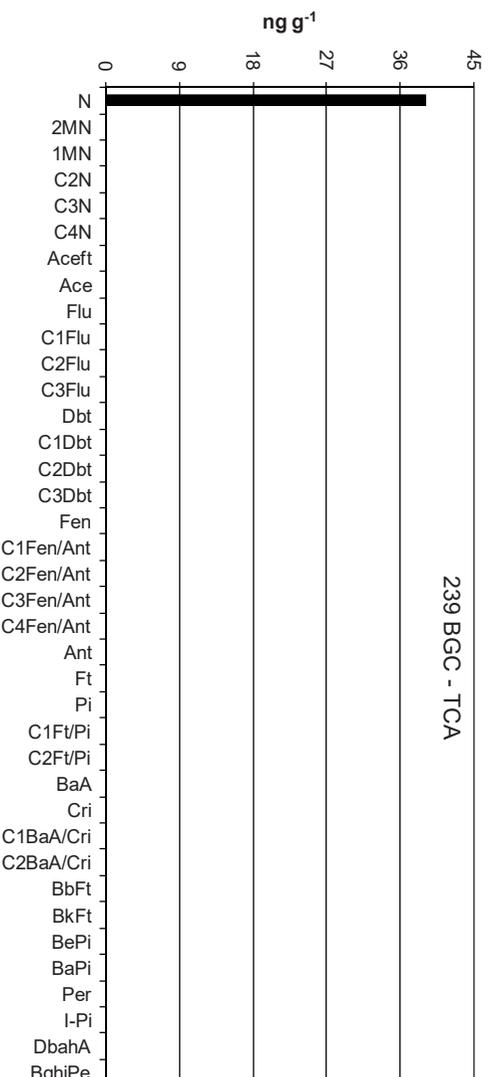
Amostra 239BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

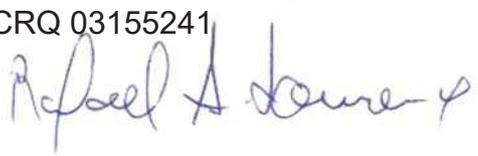


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	632/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	251BGC / 32799 – <i>S. bredanensis</i>
Data de Coleta	06/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC251		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	17,4
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			17,4
Σ HPA			17,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			90
Umidade (%)			34,2
Lipídios (%)			17,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

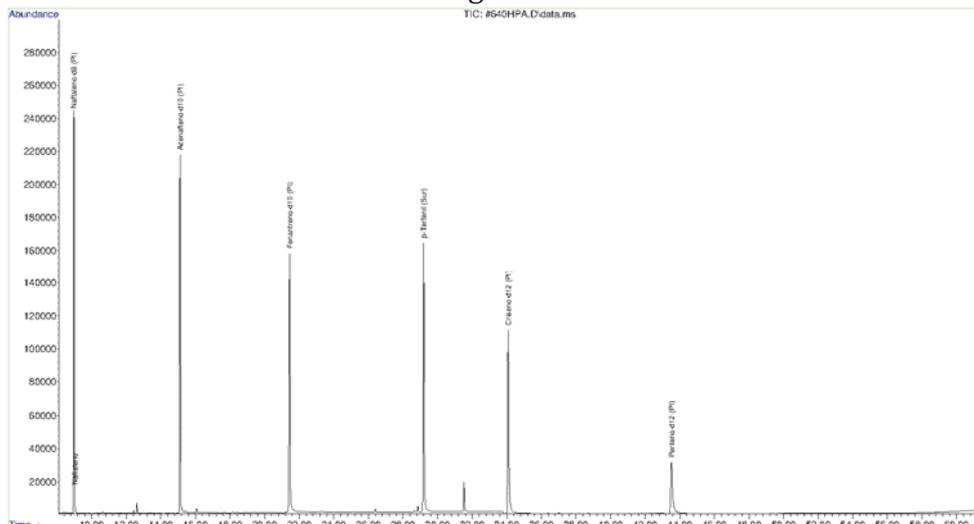
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC251		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,7	26,4
2-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,7	<0,2
Acenafteno	0,2	13,7	<0,2
Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
Fenantreno	0,5	13,7	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
Antraceno	0,2	13,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Pireno	0,2	13,7	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	13,7	<0,5
Criseno	0,5	13,7	<0,5
C1-Criseno	0,5	13,7	<0,5
C2-Criseno	0,5	13,7	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,7	<0,1
Perileno	0,1	13,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			26,4
Σ HPA			26,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			90
Umidade (%)			34,2
Lipídios (%)			17,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

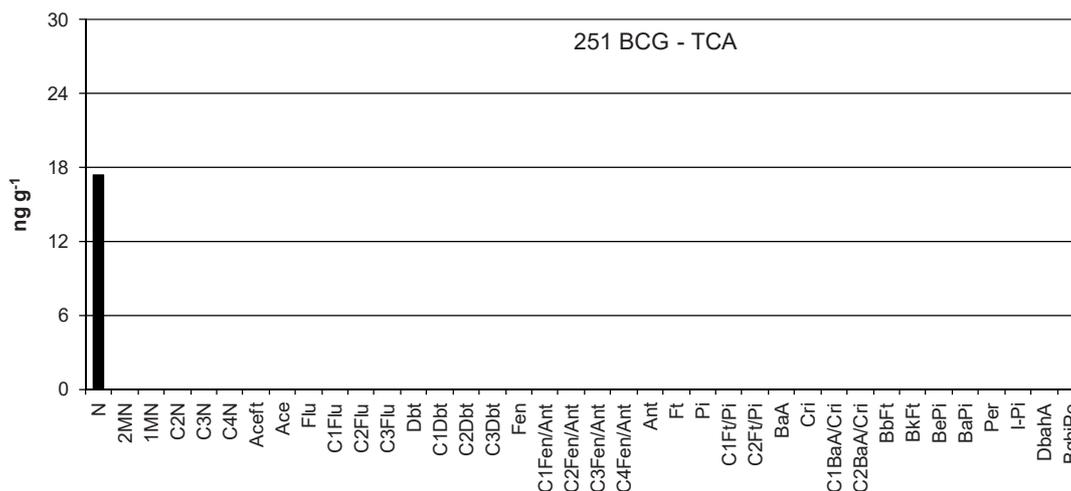
LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 251BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons

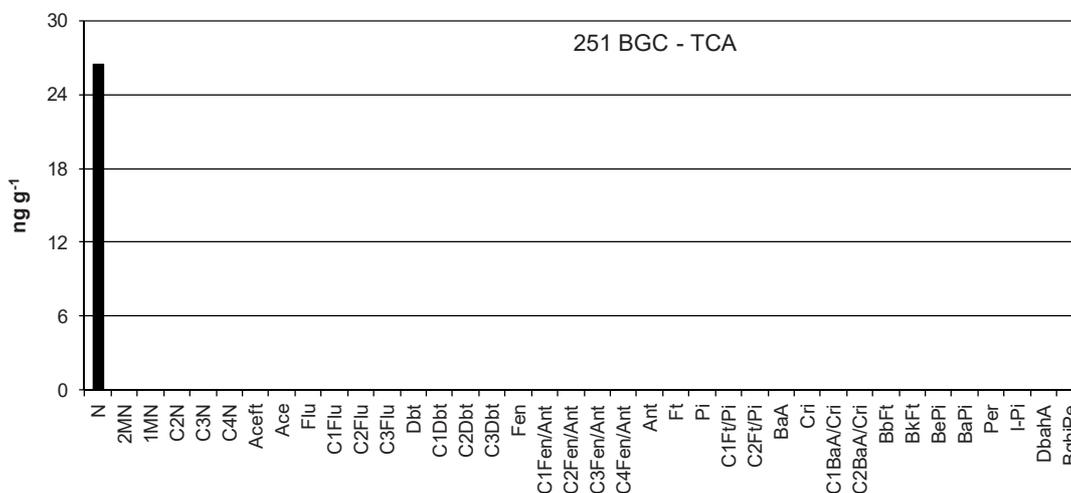


* os picos não identificados no cromatograma não correspondem aos HPAs

Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenaftileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

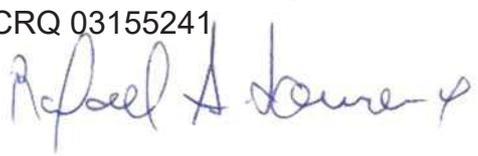


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	633/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	253BGC / 32801 – <i>P. electra</i>
Data de Coleta	06/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC253		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			94
Umidade (%)			41,3
Lipídios (%)			27,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

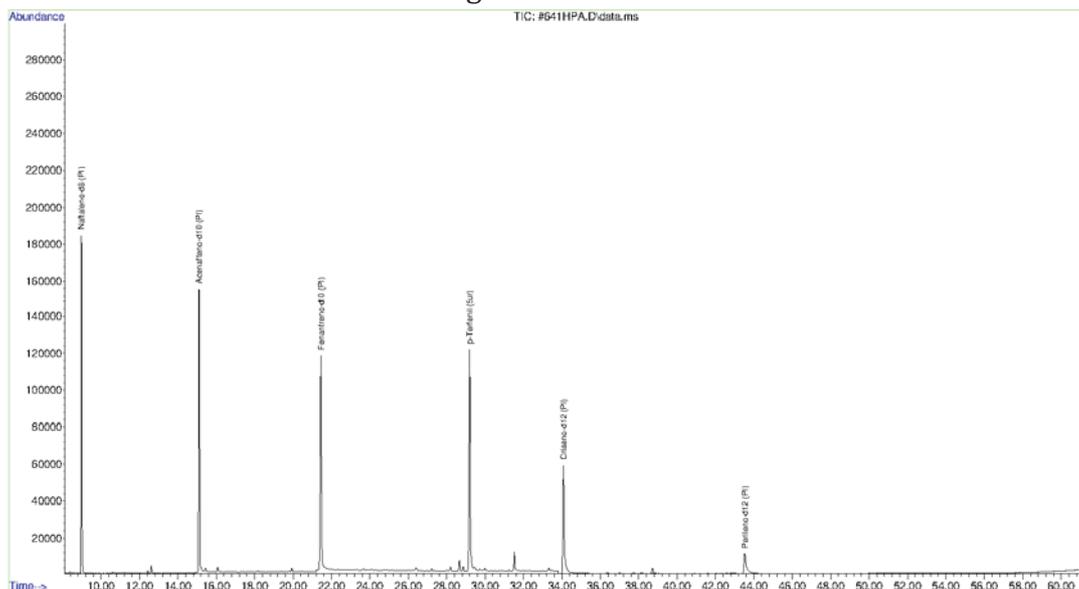
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC253		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	15,3	<1,0
2-Metilnaftaleno	1,0	15,3	<1,0
1-Metilnaftaleno	1,0	15,3	<1,0
C2-Naftaleno	1,0	15,3	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	15,3	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	15,3	<1,0
Acenaftileno	0,2	15,3	<0,2
Acenafteno	0,2	15,3	<0,2
Fluoreno	0,1	15,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	15,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	15,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	15,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	15,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	15,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	15,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	15,3	<0,3
Fenantreno	0,5	15,3	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	15,3	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	15,3	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	15,3	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	15,3	<0,5
Antraceno	0,2	15,3	<0,2
Fluoranteno	0,3	15,3	<0,3
Pireno	0,2	15,3	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	15,3	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	15,3	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	15,3	<0,5
Criseno	0,5	15,3	<0,5
C1-Criseno	0,5	15,3	<0,5
C2-Criseno	0,5	15,3	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	15,3	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	15,3	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	15,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	15,3	<0,1
Perileno	0,1	15,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	15,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	15,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	15,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			94
Umidade (%)			41,3
Lipídios (%)			27,2

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 253BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafeno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 µL, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10µ, 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 µL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng µL⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

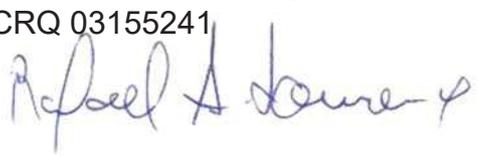


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	634/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	255BGC / 32801 – <i>P. electra</i>
Data de Coleta	06/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC255		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			37,6
Lipídios (%)			31,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

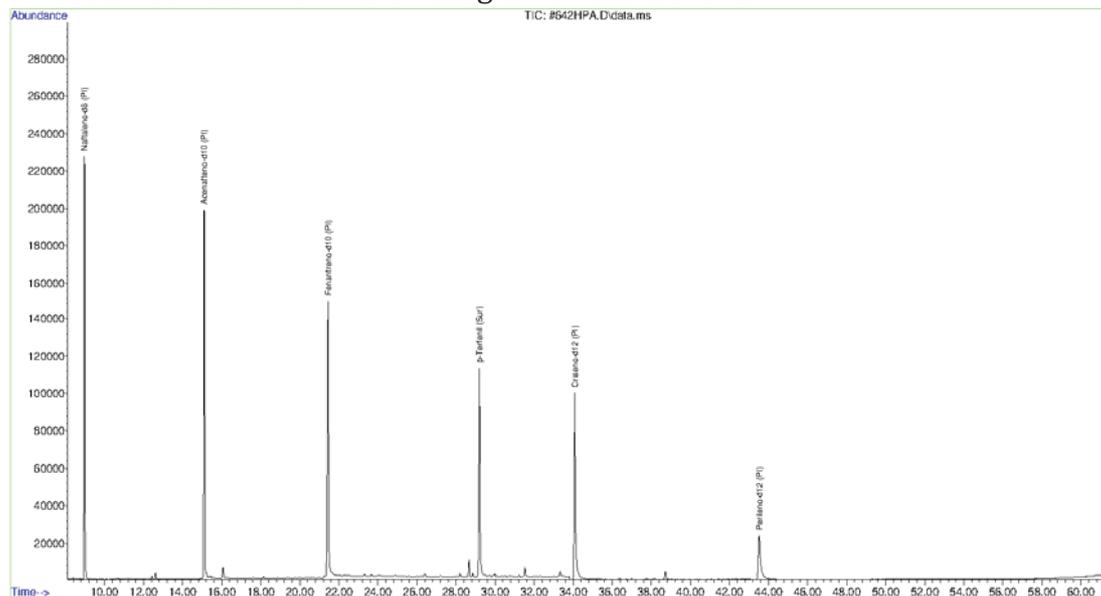
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC255		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
2-Metilnaftaleno	1,0	14,4	<1,0
1-Metilnaftaleno	1,0	14,4	<1,0
C2-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
Acenaftileno	0,2	14,4	<0,2
Acenafteno	0,2	14,4	<0,2
Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
Fenantreno	0,5	14,4	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
Antraceno	0,2	14,4	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,4	<0,3
Pireno	0,2	14,4	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,4	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,4	<0,5
Criseno	0,5	14,4	<0,5
C1-Criseno	0,5	14,4	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,4	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	14,4	<0,1
Perileno	0,1	14,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			37,6
Lipídios (%)			31,6

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 255BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

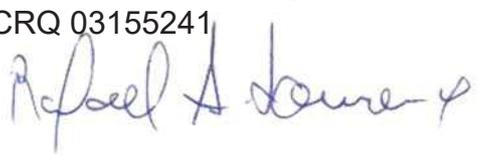


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	635/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	257BGC / 32801 – <i>P. electra</i>
Data de Coleta	06/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	15/06/2018 a 09/07/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	16/07/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC257		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
2-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	9,0	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	9,0	<0,6
Acenaftileno	0,1	9,0	<0,1
Acenafteno	0,1	9,0	<0,1
Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	9,0	<0,2
Fenantreno	0,3	9,0	<0,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	9,0	<0,3
Antraceno	0,1	9,0	<0,1
Fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Pireno	0,1	9,0	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	9,0	<0,3
Criseno	0,3	9,0	<0,3
C1-Criseno	0,3	9,0	<0,3
C2-Criseno	0,3	9,0	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	9,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	9,0	<0,1
Perileno	0,1	9,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	9,0	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	9,0	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	9,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			84
Umidade (%)			47,9
Lipídios (%)			20,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

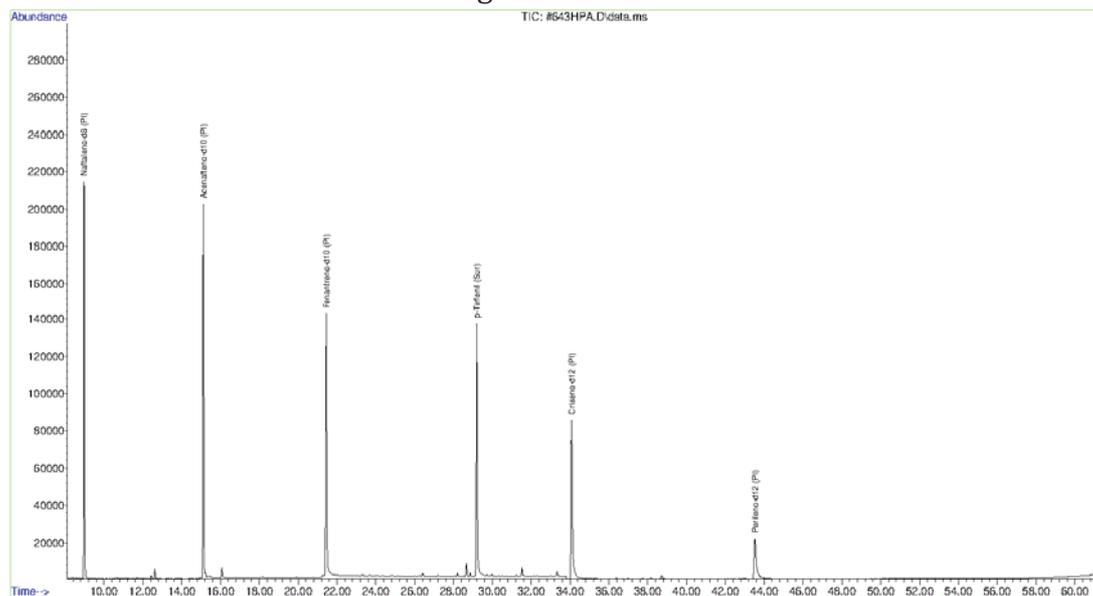
Identificador (SisPMC)/Tecido	BGC257		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,2	17,3	<1,2
2-Metilnaftaleno	1,2	17,3	<1,2
1-Metilnaftaleno	1,2	17,3	<1,2
C2-Naftaleno	1,2	17,3	<1,2
C3-Naftaleno	1,2	17,3	<1,2
C4-Naftaleno	1,2	17,3	<1,2
Acenaftileno	0,2	17,3	<0,2
Acenafteno	0,2	17,3	<0,2
Fluoreno	0,1	17,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	17,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	17,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	17,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,4	17,3	<0,4
C1-Dibenzotiofeno	0,4	17,3	<0,4
C2-Dibenzotiofeno	0,4	17,3	<0,4
C3-Dibenzotiofeno	0,4	17,3	<0,4
Fenantreno	0,6	17,3	<0,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	17,3	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	17,3	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	17,3	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	17,3	<0,6
Antraceno	0,2	17,3	<0,2
Fluoranteno	0,3	17,3	<0,3
Pireno	0,2	17,3	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	17,3	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	17,3	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	17,3	<0,6
Criseno	0,6	17,3	<0,6
C1-Criseno	0,6	17,3	<0,6
C2-Criseno	0,6	17,3	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	17,3	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	17,3	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	17,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	17,3	<0,1
Perileno	0,1	17,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	17,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	17,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	17,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			84
Umidade (%)			47,9
Lipídios (%)			20,4

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 257BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras retiradas de carcaças em código 2 foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto entre 0,3 e 0,5 g de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,25 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (500 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Perkin Elmer (LC-250) acoplado a um detector de UV/Visível (Perkin Elmer, LC-95) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector UV/visível em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 900 μ L onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 1,0 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	Amostra 42450 (FIG) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	34,2	50,0	68,4	39,8	50,0	79,6
Acenafileno	<0,1	<0,1	32,1	50,0	64,2	34,8	50,0	69,6
Acenafteno	<0,1	<0,1	30,1	50,0	60,2	36,8	50,0	73,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	32,5	50,0	65,0	34,7	50,0	69,4
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	33,8	50,0	67,6	38,5	50,0	77,0
Fenantreno	<0,3	<0,3	36,8	50,0	73,6	35,9	50,0	71,8
Antraceno	<0,1	<0,1	36,4	50,0	72,8	31,1	50,0	62,2
Fluoranteno	<0,2	<0,2	37,8	50,0	75,6	32,5	50,0	65,0
Pireno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	36,9	50,0	73,8
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	40,9	50,0	81,8	39,9	50,0	79,8
Criseno	<0,3	<0,3	41,7	50,0	83,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	32,5	50,0	65,0	36,5	50,0	73,0
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	36,9	50,0	73,8	31,7	50,0	63,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	39,8	50,0	79,6	30,8	50,0	61,6
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	34,8	50,0	69,6	33,8	50,0	67,6
Perileno	<0,1	<0,1	34,6	50,0	69,2	33,7	50,0	67,4
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	37,1	50,0	74,2	34,8	50,0	69,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	32,2	50,0	64,4	34,9	50,0	69,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	36,5	50,0	73,0	32,9	50,0	65,8

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 031

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bícago, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralorchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

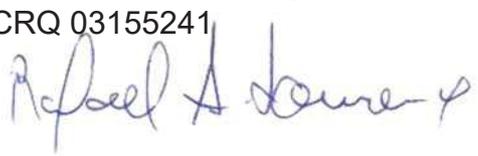


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	782/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	002BGC / 24088 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	30/12/2015
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	002BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	16,7
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	8,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			24,9
Σ HPA			24,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			59
Umidade (%)			58,4
Lipídios (%)			15,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

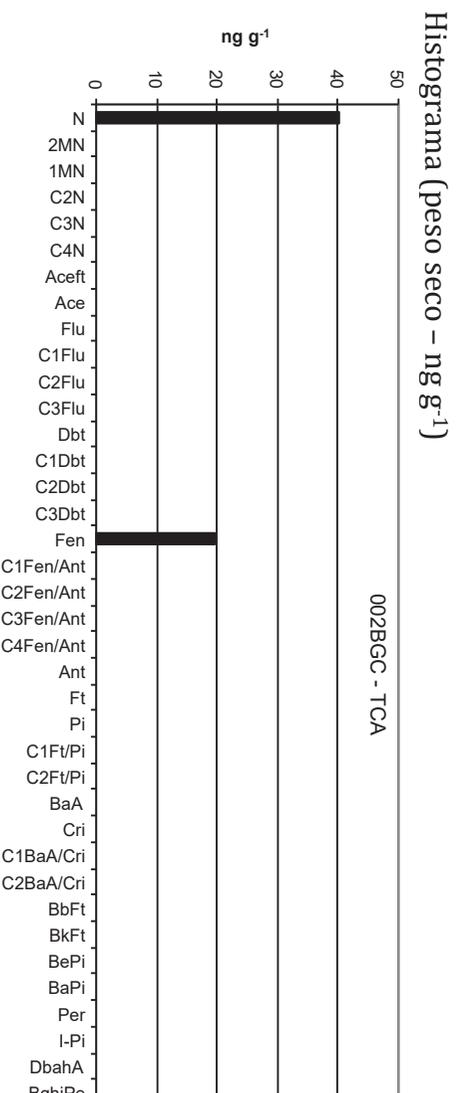
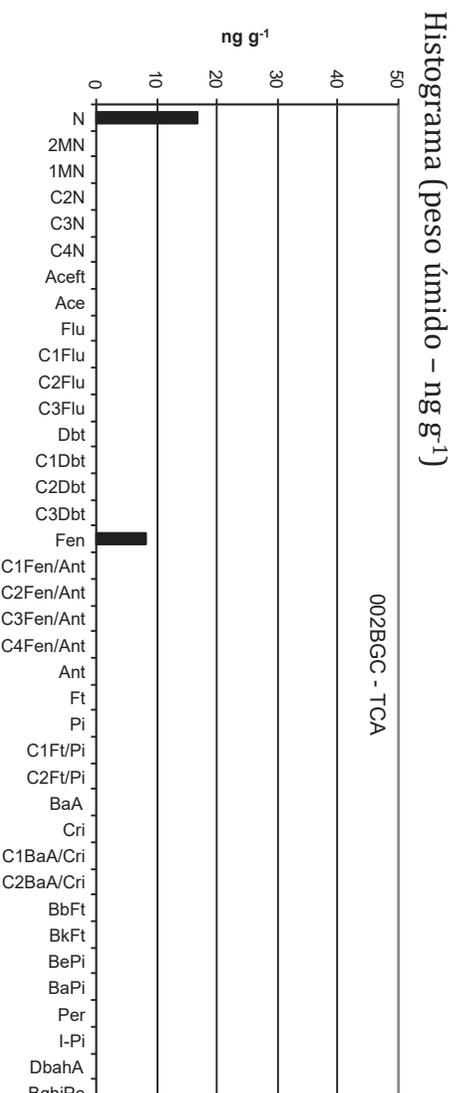
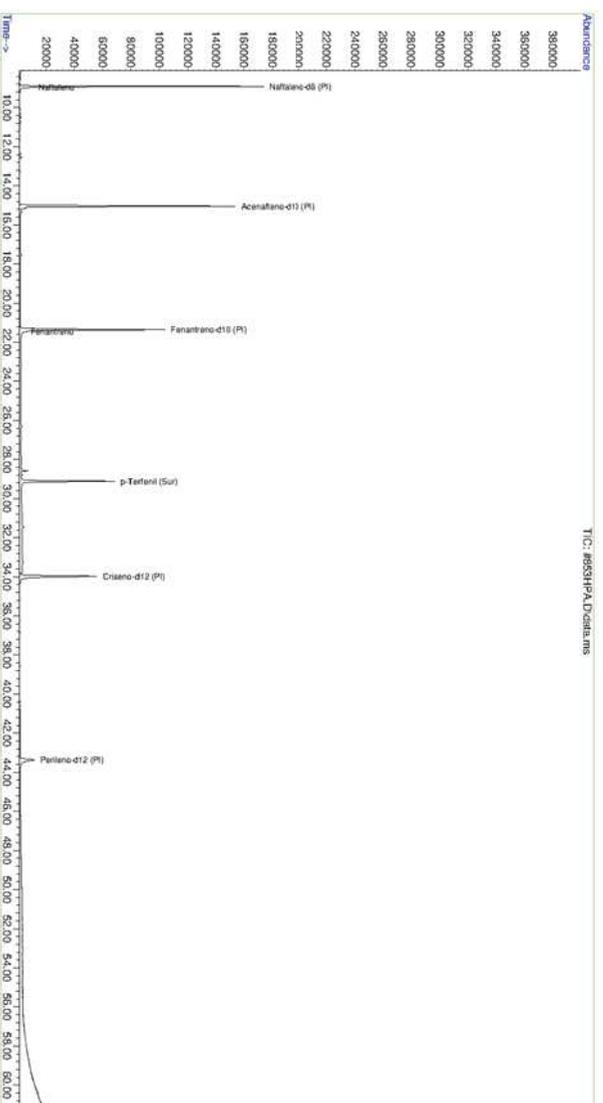
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	002BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,5	40,1
2-Metilnaftaleno	0,9	13,5	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,5	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,5	<0,2
Acenafteno	0,2	13,5	<0,2
Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
Fenantreno	0,5	13,5	19,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	13,5	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	13,5	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	13,5	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	13,5	<0,5
Antraceno	0,2	13,5	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Pireno	0,2	13,5	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,5	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	13,5	<0,5
Criseno	0,5	13,5	<0,5
C1-Criseno	0,5	13,5	<0,5
C2-Criseno	0,5	13,5	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,5	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,5	<0,1
Perileno	0,1	13,5	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,5	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,5	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,5	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			59,9
Σ HPA			59,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			59
Umidade (%)			58,4
Lipídios (%)			15,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 002BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

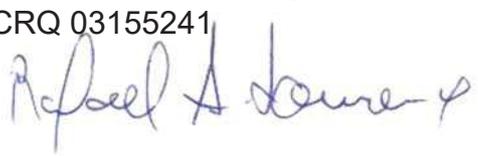


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	783/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	005BGC / 25066 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	25/02/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	005BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			51
Umidade (%)			59,0
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

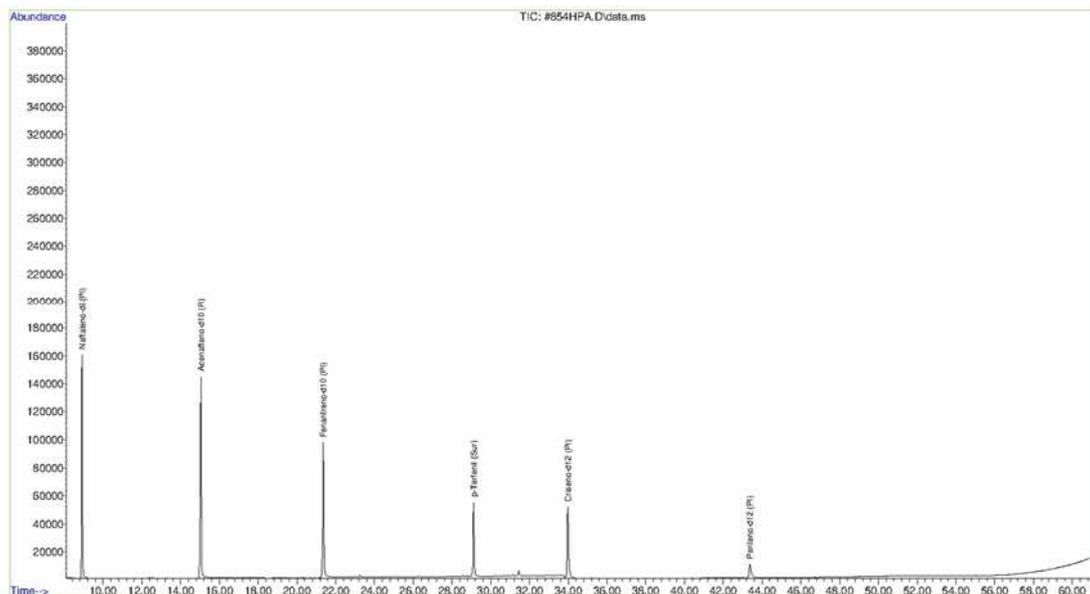
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	005BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
2-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,7	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,7	<0,2
Acenafteno	0,2	13,7	<0,2
Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
Fenantreno	0,5	13,7	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
Antraceno	0,2	13,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Pireno	0,2	13,7	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	13,7	<0,5
Criseno	0,5	13,7	<0,5
C1-Criseno	0,5	13,7	<0,5
C2-Criseno	0,5	13,7	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,7	<0,1
Perileno	0,1	13,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			<LD
Σ HPA			<LD
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			51
Umidade (%)			59,0
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Amostra 005BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹ (0,0025 ng µL⁻¹, 0,005 ng µL⁻¹, 0,025 ng µL⁻¹, 0,050 ng µL⁻¹, 0,25 ng µL⁻¹ e 0,50 ng µL⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R²) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂, em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenafileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere* (Oxford), v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralorchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

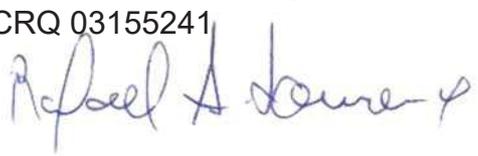


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	784/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	007BGC / 25076 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	25/02/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	007BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	22,3
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			22,3
Σ HPA			22,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			52
Umidade (%)			52,8
Lipídios (%)			5,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

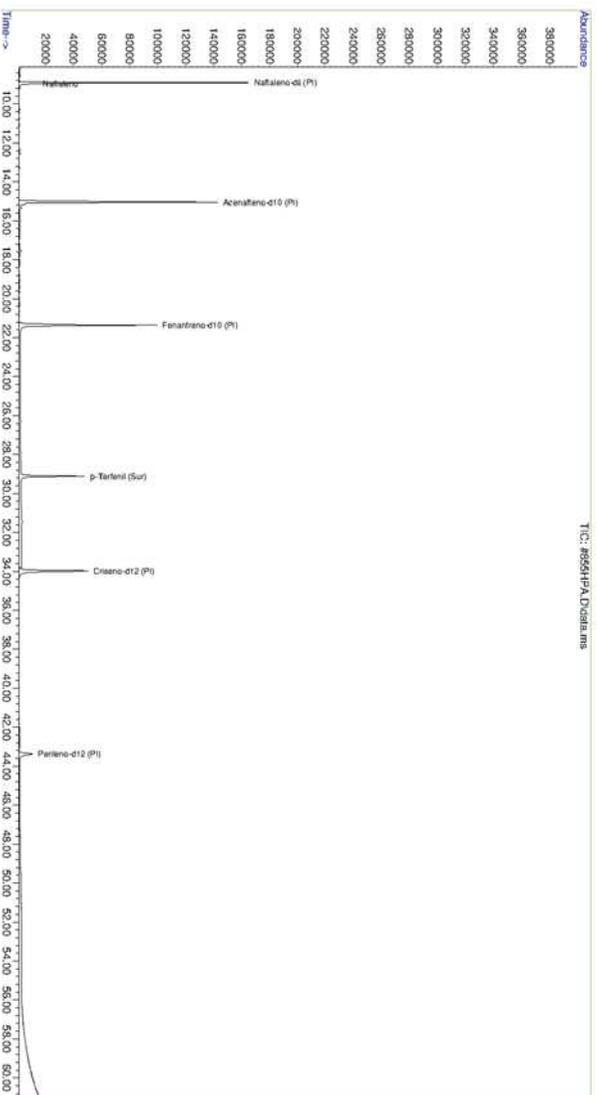
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	007BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,9	47,1
2-Metilnaftaleno	0,8	11,9	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	11,9	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,9	<0,2
Acenafteno	0,2	11,9	<0,2
Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
Fenantreno	0,4	11,9	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
Antraceno	0,2	11,9	<0,2
Fluoranteno	0,2	11,9	<0,2
Pireno	0,2	11,9	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,9	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,9	<0,4
Criseno	0,4	11,9	<0,4
C1-Criseno	0,4	11,9	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,9	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,9	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	11,9	<0,1
Perileno	0,1	11,9	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,9	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,9	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			47,1
Σ HPA			47,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			52
Umidade (%)			52,8
Lipídios (%)			5,0

TCA = Amostra de Gordura

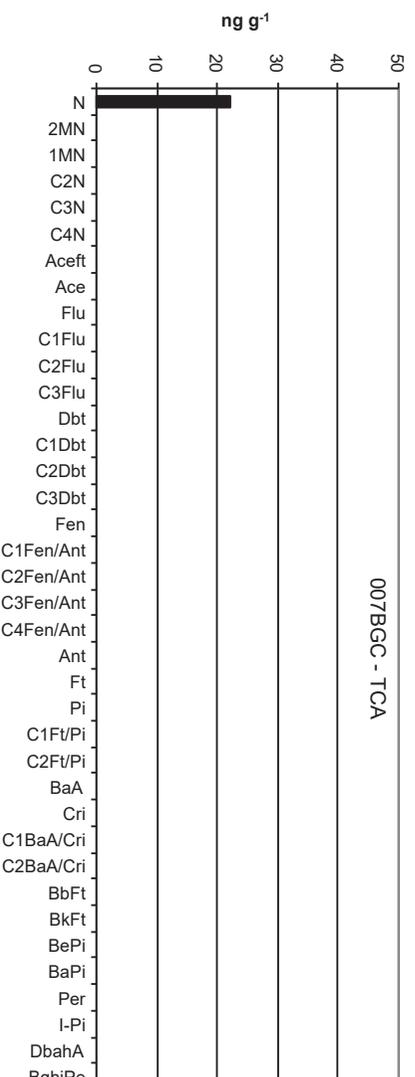
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

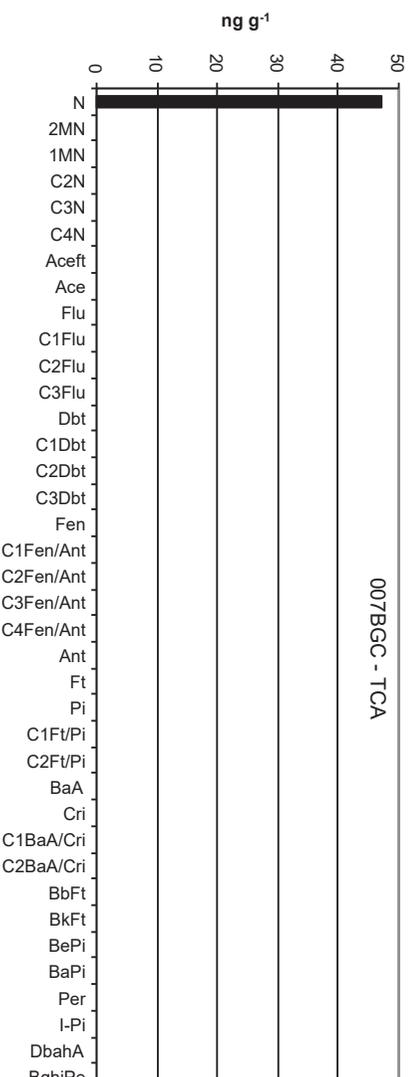
Amostra 007BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

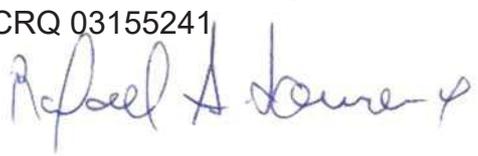


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	785/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	012BGC / 25105 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	28/02/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido			012BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	25,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	8,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			33,6
Σ HPA			33,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			71
Umidade (%)			54,7
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

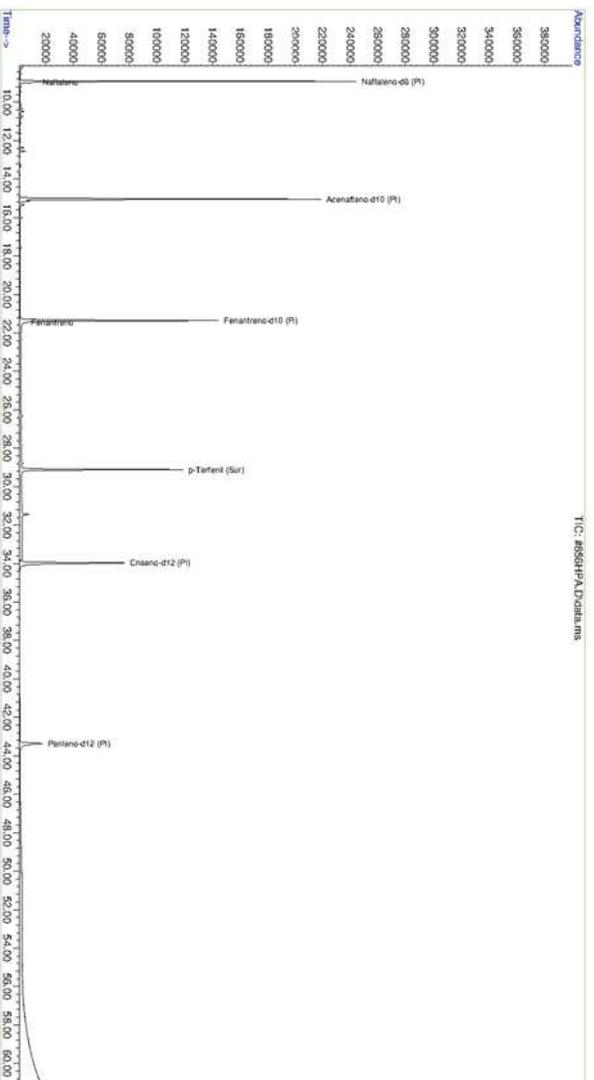
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	012BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,4	56,1
2-Metilnaftaleno	0,8	12,4	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,4	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,4	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,4	<0,2
Acenafteno	0,2	12,4	<0,2
Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,4	<0,3
Fenantreno	0,4	12,4	18,0
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,4	<0,4
Antraceno	0,2	12,4	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Pireno	0,2	12,4	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,4	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,4	<0,4
Criseno	0,4	12,4	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,4	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,4	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,4	<0,1
Perileno	0,1	12,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			74,1
Σ HPA			74,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			71
Umidade (%)			54,7
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

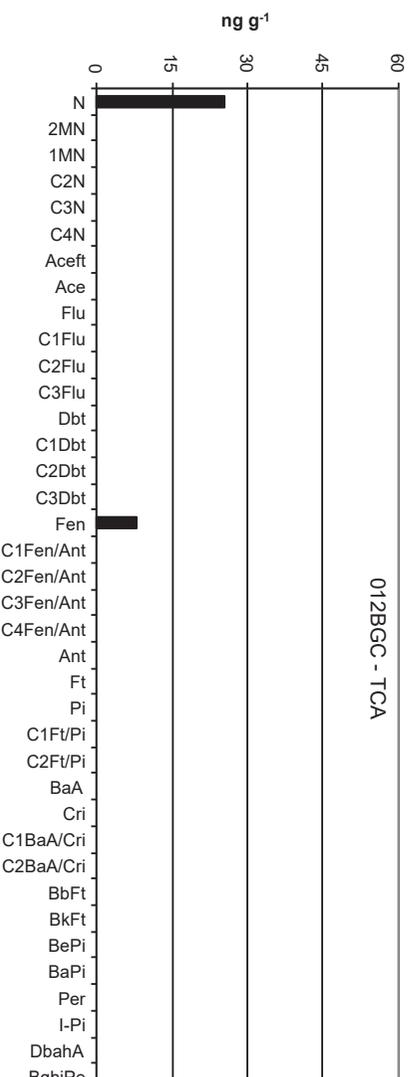
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

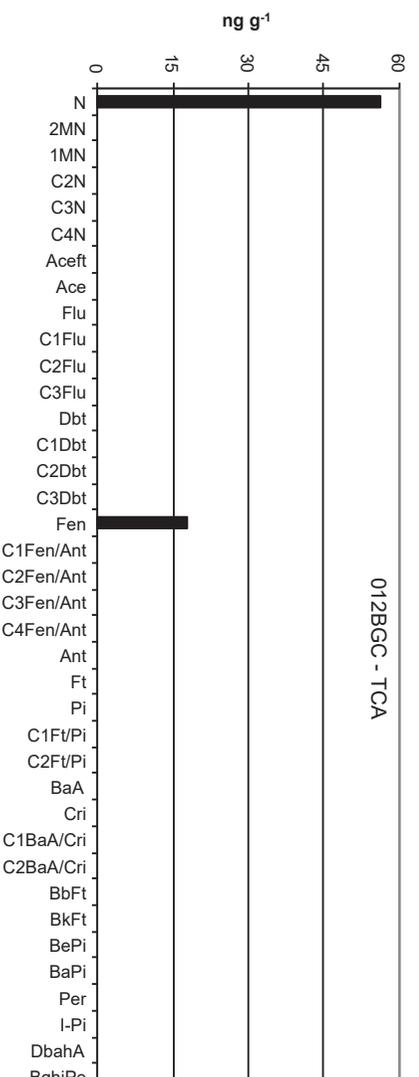
Amostra 012BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

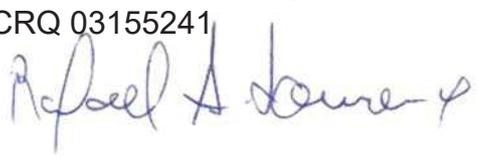


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	786/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	017BGC / 25133 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	05/03/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	017BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	27,8
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	8,9
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			36,6
Σ HPA			36,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			54,3
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

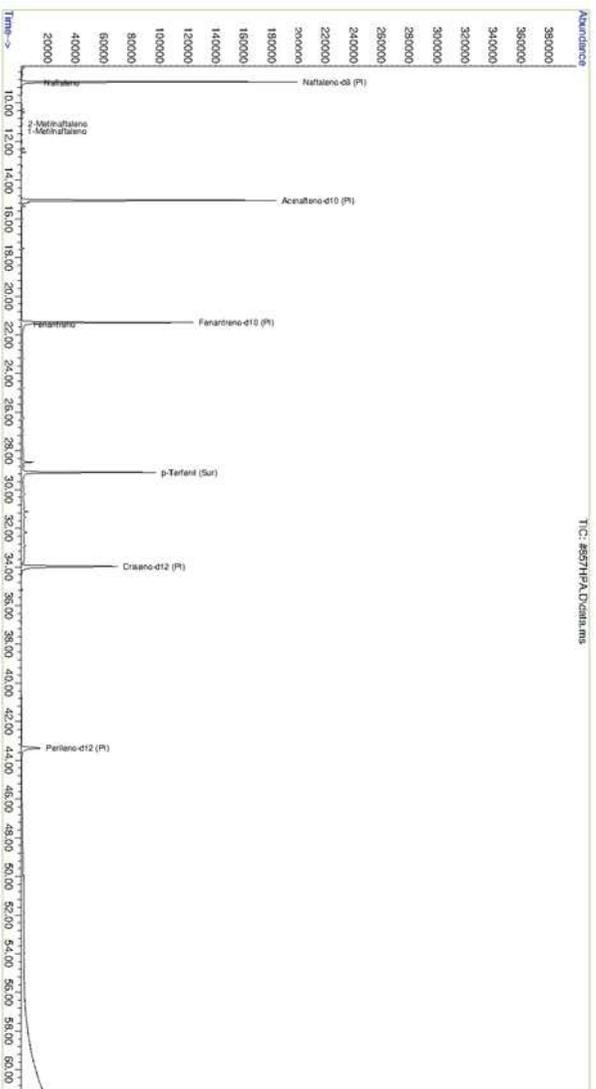
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	017BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,3	60,7
2-Metilnaftaleno	0,8	12,3	<12,3
1-Metilnaftaleno	0,8	12,3	<12,3
C2-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,3	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,3	<0,2
Acenafteno	0,2	12,3	<0,2
Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,3	<0,3
Fenantreno	0,4	12,3	19,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,3	<0,4
Antraceno	0,2	12,3	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Pireno	0,2	12,3	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,3	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,3	<0,4
Criseno	0,4	12,3	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,3	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,3	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,3	<0,1
Perileno	0,1	12,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			80,1
Σ HPA			80,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			54,3
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

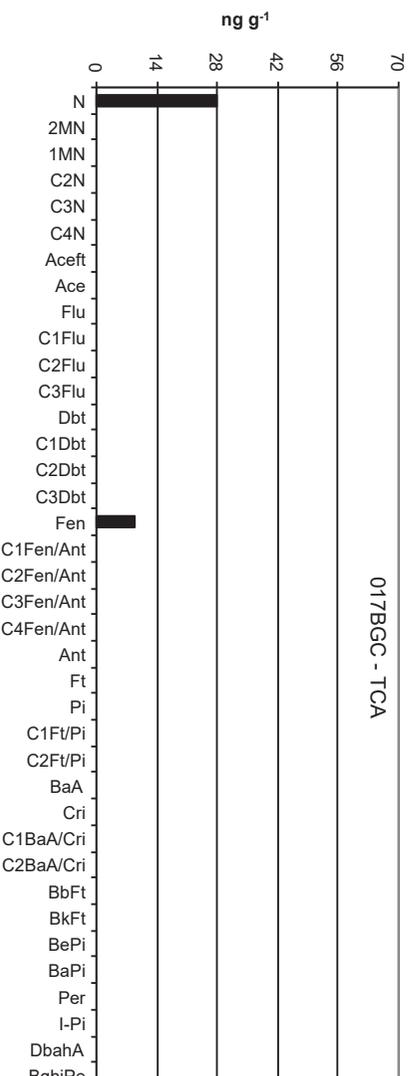
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

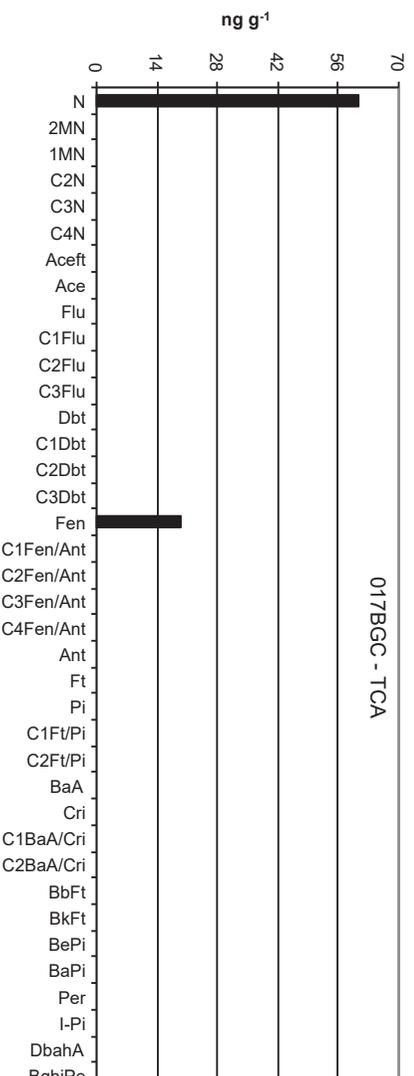
Amostra 017BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

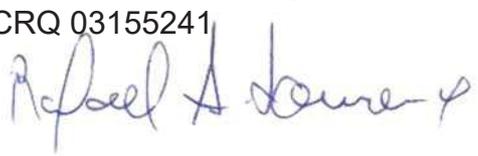


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	787/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	028BGC / 25209 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	15/03/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	028BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	25,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			25,4
Σ HPA			25,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			95
Umidade (%)			58,1
Lipídios (%)			1,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

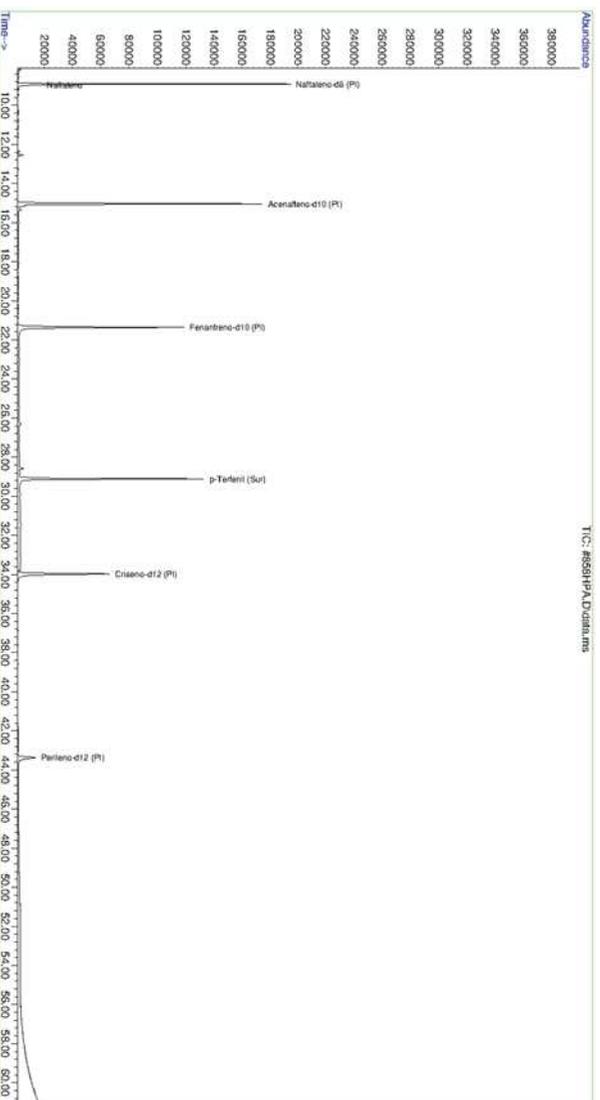
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	028BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,4	60,5
2-Metilnaftaleno	0,9	13,4	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,4	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,4	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,4	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,4	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,4	<0,2
Acenafteno	0,2	13,4	<0,2
Fluoreno	0,1	13,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,4	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,4	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,4	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,4	<0,3
Fenantreno	0,4	13,4	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,4	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,4	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,4	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,4	<0,4
Antraceno	0,2	13,4	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,4	<0,3
Pireno	0,2	13,4	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,4	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,4	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,4	<0,4
Criseno	0,4	13,4	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,4	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,4	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,4	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,4	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,4	<0,1
Perileno	0,1	13,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			60,5
Σ HPA			60,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			95
Umidade (%)			58,1
Lipídios (%)			1,0

TCA = Amostra de Gordura

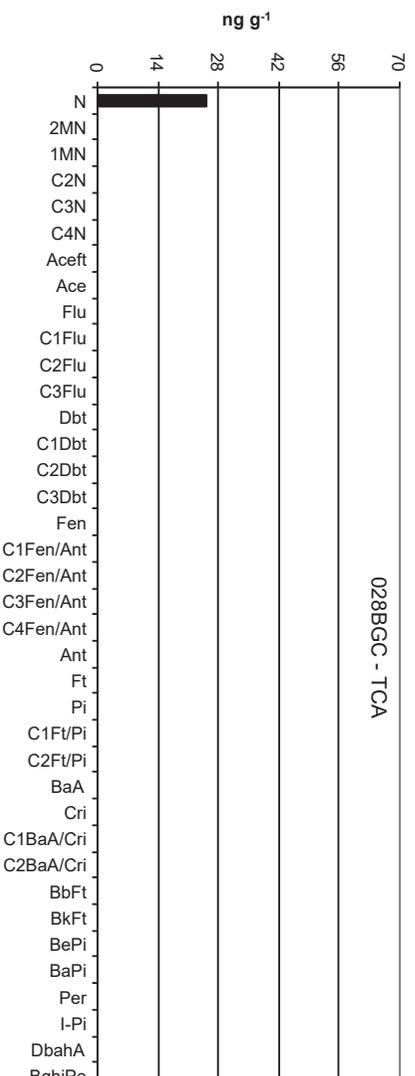
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

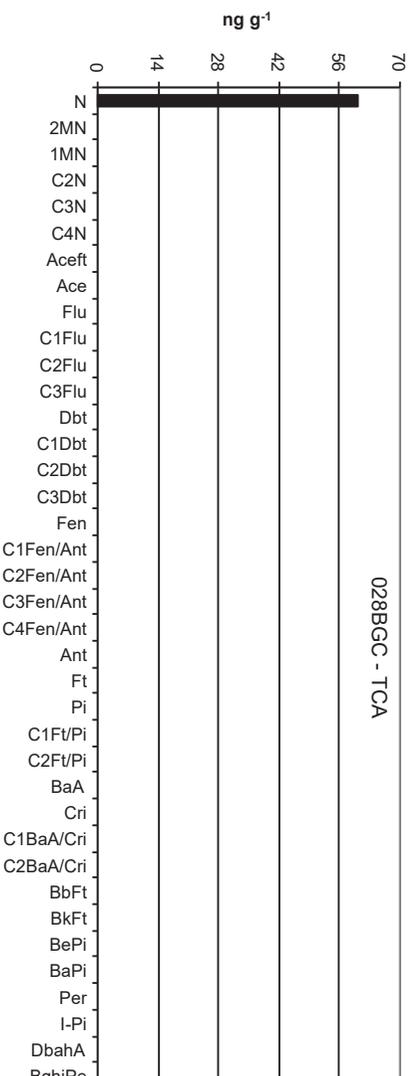
Amostra 028BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

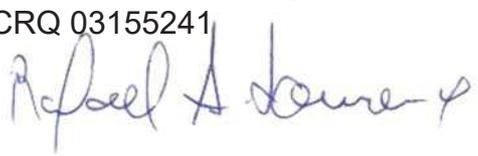


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	788/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	037BGC / 25209 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	26/05/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	037BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	25,2
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	7,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			32,4
Σ HPA			32,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			57,0
Lipídios (%)			5,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

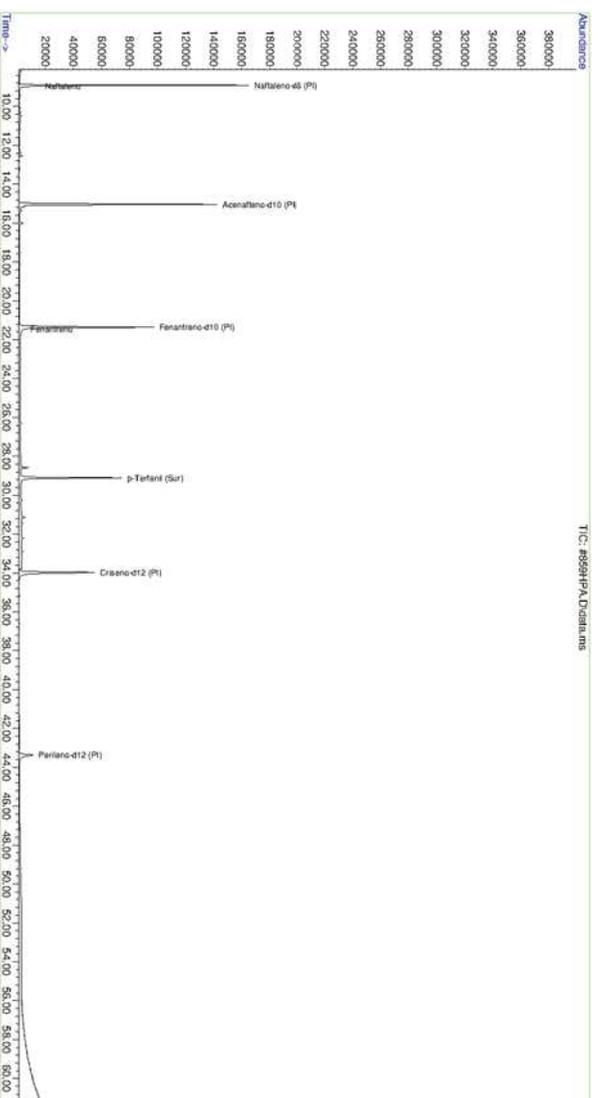
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	037BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,1	58,5
2-Metilnaftaleno	0,9	13,1	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,1	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,1	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,1	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,1	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,1	<0,2
Acenafteno	0,2	13,1	<0,2
Fluoreno	0,1	13,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,1	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,1	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,1	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,1	<0,3
Fenantreno	0,4	13,1	16,9
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,1	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,1	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,1	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,1	<0,4
Antraceno	0,2	13,1	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,1	<0,3
Pireno	0,2	13,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,1	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,1	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,1	<0,4
Criseno	0,4	13,1	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,1	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,1	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,1	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,1	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,1	<0,1
Perileno	0,1	13,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			75,5
Σ HPA			75,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			57,0
Lipídios (%)			5,0

TCA = Amostra de Gordura

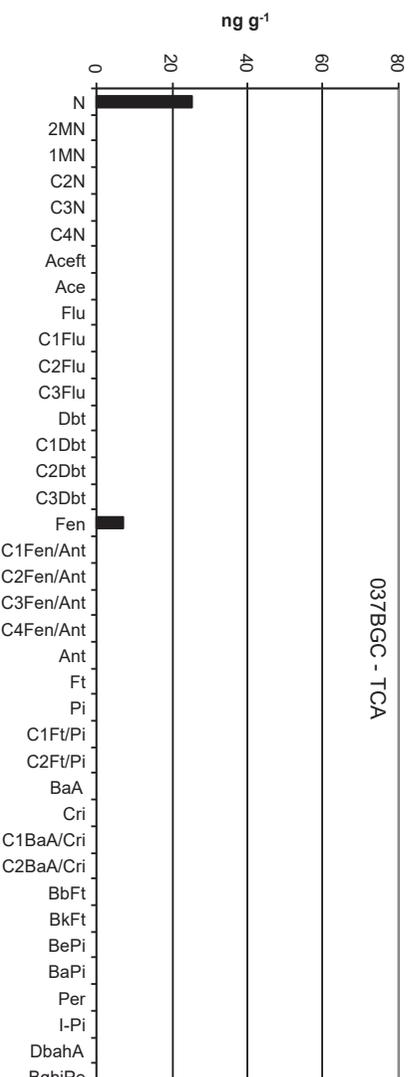
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

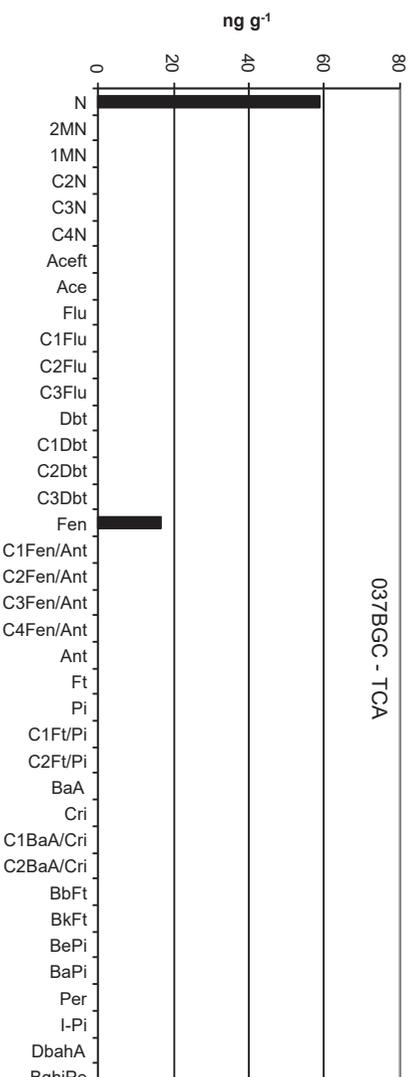
Amostra 037BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g^{-1})



Histograma (peso seco – ng g^{-1})



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL⁻¹. OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra (LD = 3 x DP) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g⁻¹). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g⁻¹.

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

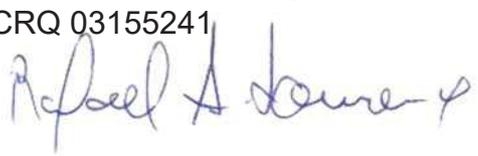


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	789/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	048BGC / 24518 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	17/06/2016
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	048BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	30,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	8,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			38,7
Σ HPA			38,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			53,8
Lipídios (%)			3,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

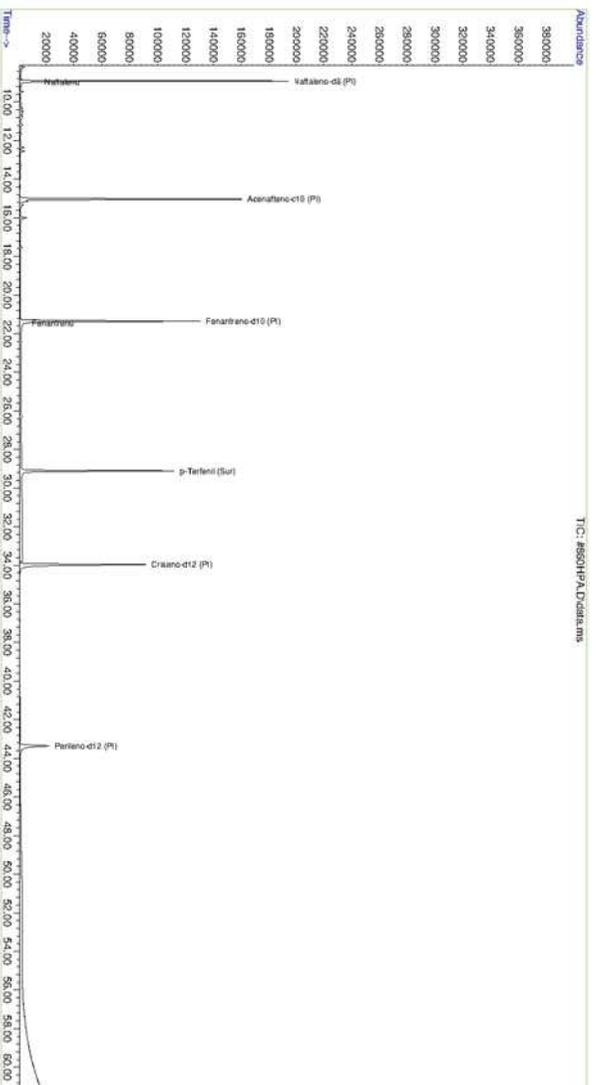
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	048BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,2	65,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,2	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,2	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,2	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,2	<0,2
Acenafteno	0,2	12,2	<0,2
Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,2	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,2	<0,3
Fenantreno	0,4	12,2	18,0
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,2	<0,4
Antraceno	0,2	12,2	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Pireno	0,2	12,2	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,2	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,2	<0,4
Criseno	0,4	12,2	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,2	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,2	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,2	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,2	<0,1
Perileno	0,1	12,2	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,2	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,2	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,2	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			83,8
Σ HPA			83,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			75
Umidade (%)			53,8
Lipídios (%)			3,0

TCA = Amostra de Gordura

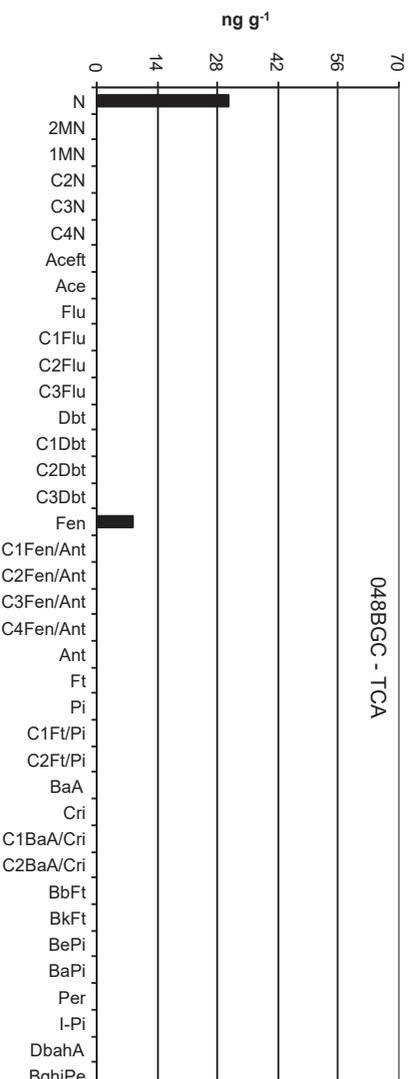
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

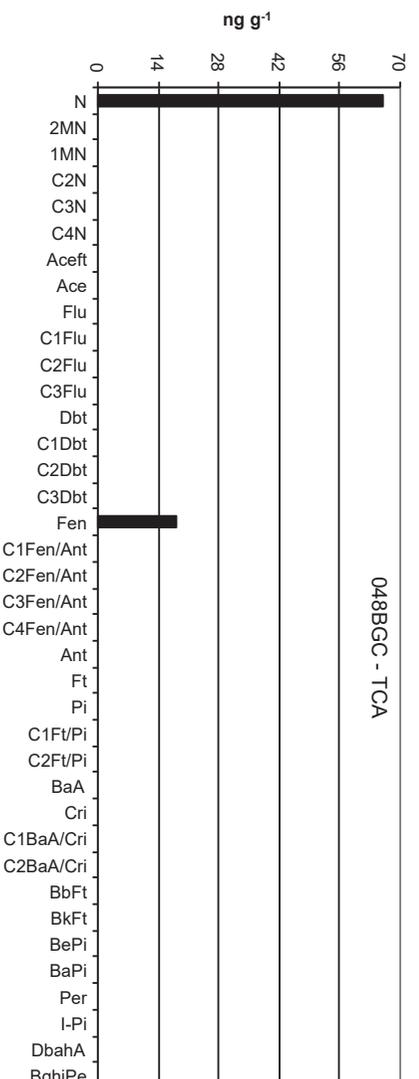
Amostra 048BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

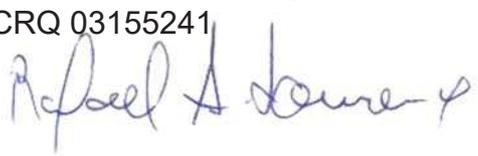


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	790/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	064BGC / 28420 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	28/08/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	064BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	20,0
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	7,0
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			27,0
Σ HPA			27,0
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			58
Umidade (%)			52,9
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

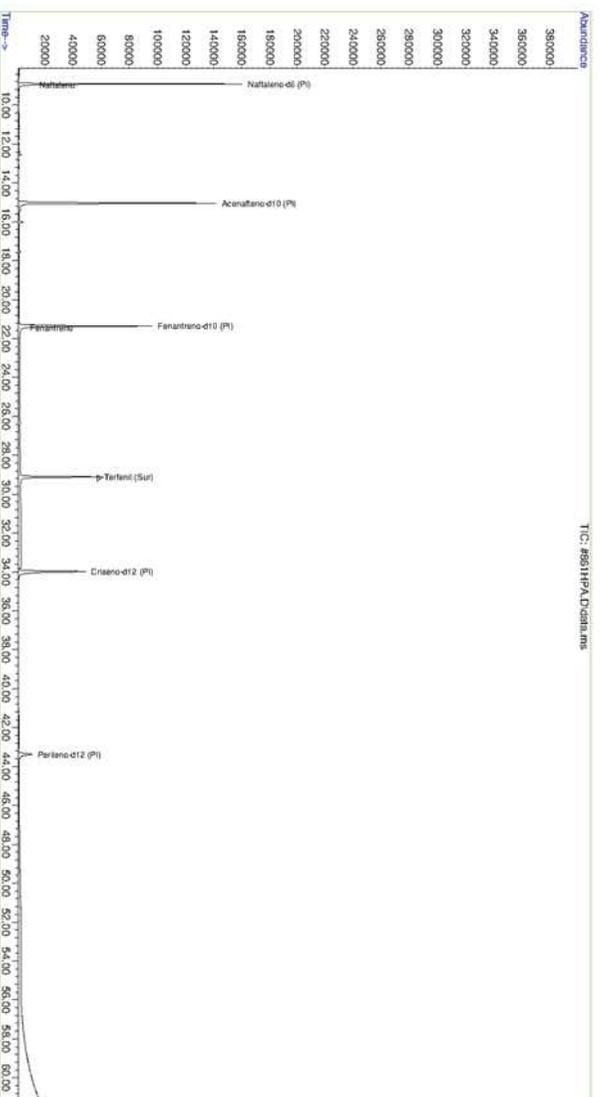
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	064BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,0	42,5
2-Metilnaftaleno	0,8	12,0	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,0	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,0	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,0	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,0	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,0	<0,2
Acenafteno	0,2	12,0	<0,2
Fluoreno	0,1	12,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	12,0	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	12,0	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	12,0	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	12,0	<0,2
Fenantreno	0,4	12,0	14,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,0	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,0	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,0	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,0	<0,4
Antraceno	0,2	12,0	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,0	<0,2
Pireno	0,2	12,0	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,0	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,0	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,0	<0,4
Criseno	0,4	12,0	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,0	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,0	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,0	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,0	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,0	<0,1
Perileno	0,1	12,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,0	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,0	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			57,3
Σ HPA			57,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			58
Umidade (%)			52,9
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

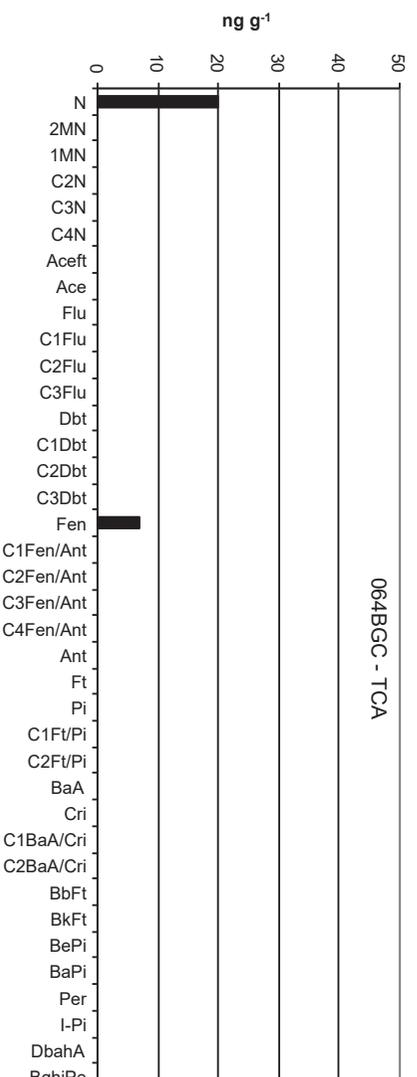
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

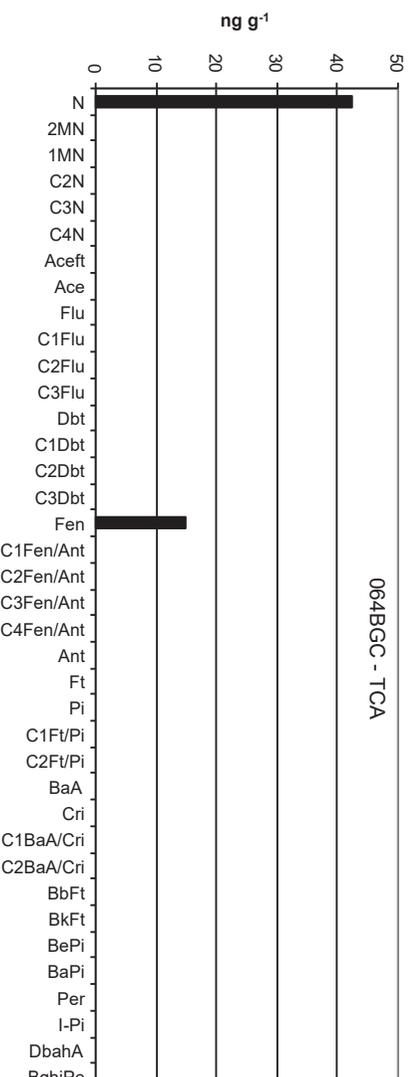
Amostra 064BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

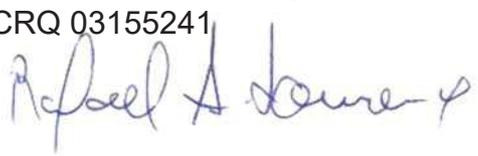


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	791/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	065BGC / 28420 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	28/08/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	065BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	38,3
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	5,9
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			38,3
Σ HPA			44,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			60
Umidade (%)			62,4
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

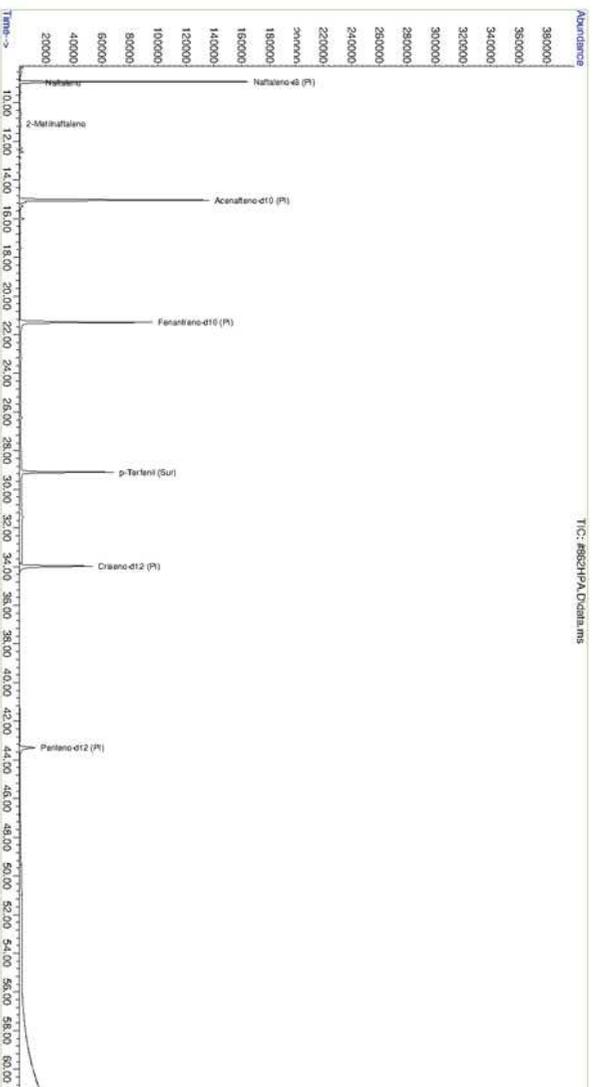
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	065BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	15,0	101,7
2-Metilnaftaleno	1,0	15,0	15,6
1-Metilnaftaleno	1,0	15,0	<1,0
C2-Naftaleno	1,0	15,0	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	15,0	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	15,0	<1,0
Acenaftileno	0,2	15,0	<0,2
Acenafteno	0,2	15,0	<0,2
Fluoreno	0,1	15,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	15,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	15,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	15,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	15,0	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	15,0	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	15,0	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	15,0	<0,3
Fenantreno	0,5	15,0	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	15,0	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	15,0	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	15,0	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	15,0	<0,5
Antraceno	0,2	15,0	<0,2
Fluoranteno	0,3	15,0	<0,3
Pireno	0,2	15,0	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	15,0	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	15,0	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	15,0	<0,5
Criseno	0,5	15,0	<0,5
C1-Criseno	0,5	15,0	<0,5
C2-Criseno	0,5	15,0	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	15,0	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	15,0	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	15,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	15,0	<0,1
Perileno	0,1	15,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	15,0	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	15,0	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	15,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			101,7
Σ HPA			117,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			60
Umidade (%)			62,4
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

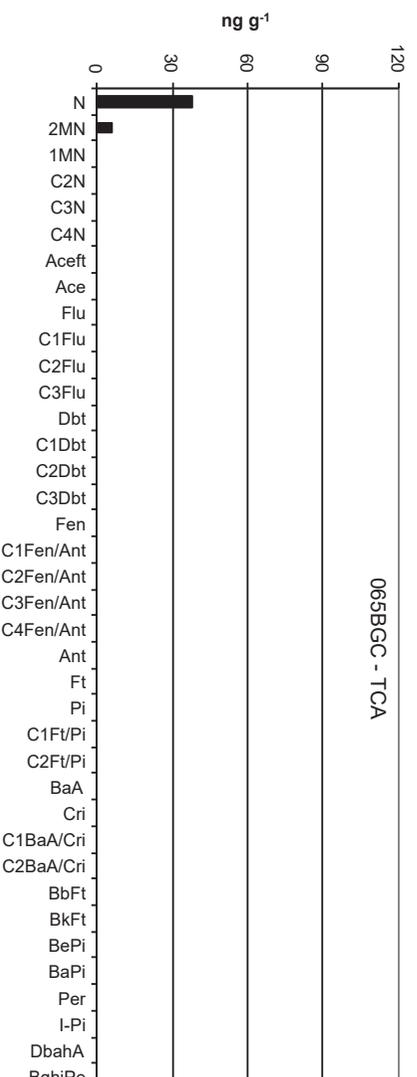
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

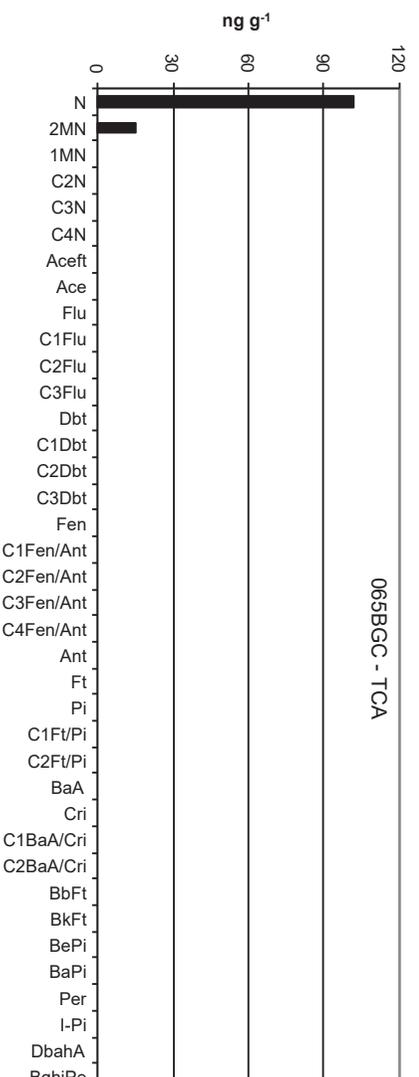
Amostra 065BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

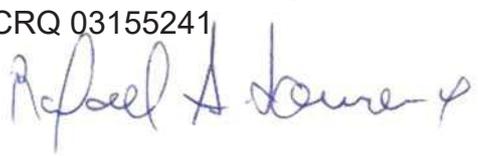


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	792/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	084BGC / 29656 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	02/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	084BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	21,3
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			21,3
Σ HPA			21,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			63
Umidade (%)			60,0
Lipídios (%)			11,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

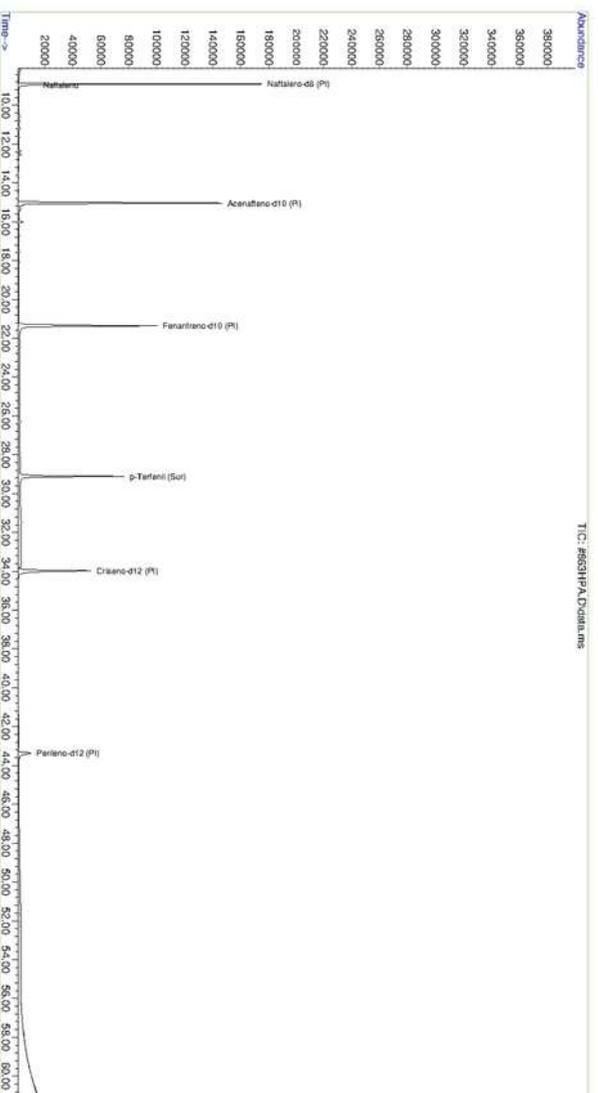
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	084BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	14,1	53,1
2-Metilnaftaleno	0,9	14,1	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	14,1	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	14,1	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	14,1	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	14,1	<0,9
Acenaftileno	0,2	14,1	<0,2
Acenafteno	0,2	14,1	<0,2
Fluoreno	0,1	14,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	14,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,1	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,1	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,1	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,1	<0,3
Fenantreno	0,5	14,1	<0,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,1	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,1	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,1	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,1	<0,5
Antraceno	0,2	14,1	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,1	<0,3
Pireno	0,2	14,1	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,1	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,1	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,1	<0,5
Criseno	0,5	14,1	<0,5
C1-Criseno	0,5	14,1	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,1	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,1	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,1	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	14,1	<0,1
Perileno	0,1	14,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			53,1
Σ HPA			53,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			63
Umidade (%)			60,0
Lipídios (%)			11,0

TCA = Amostra de Gordura

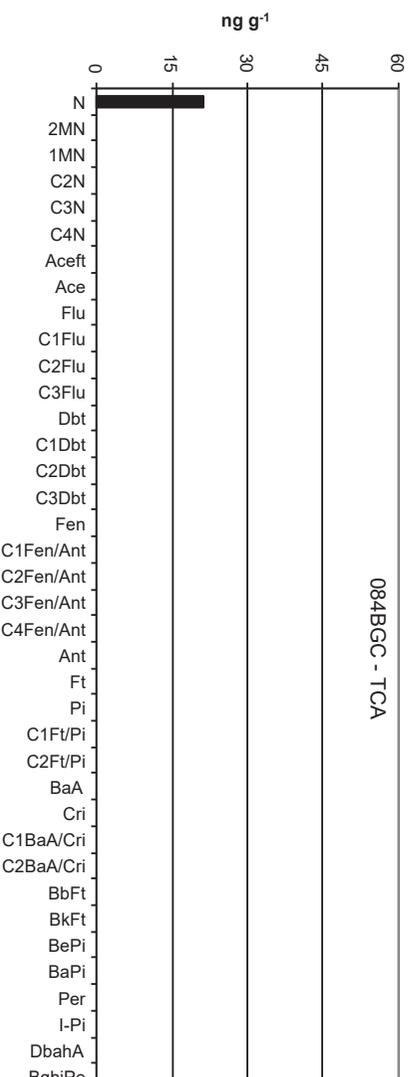
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

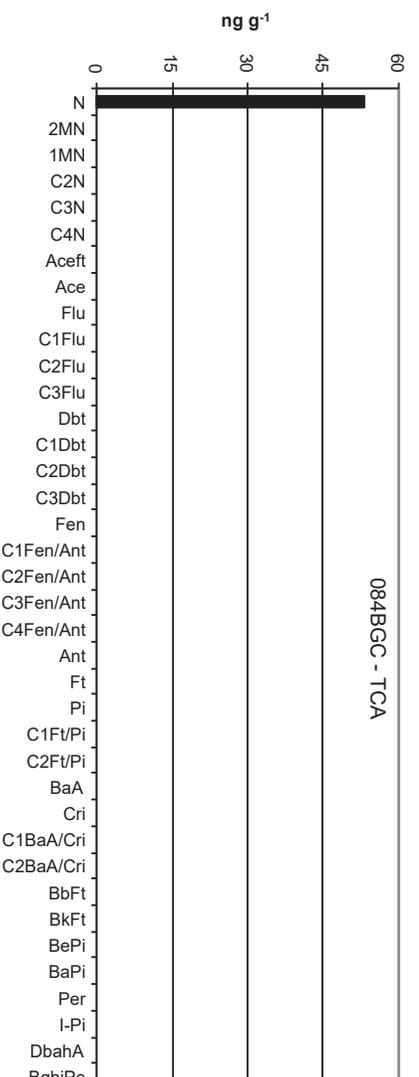
Amostra 084BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

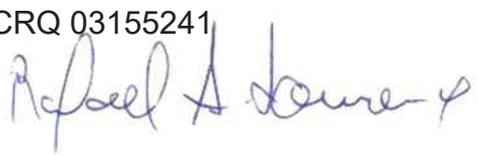


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	793/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	089BGC / 29688 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	05/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	089BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	30,3
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	9,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			39,6
Σ HPA			39,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			87
Umidade (%)			56,7
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

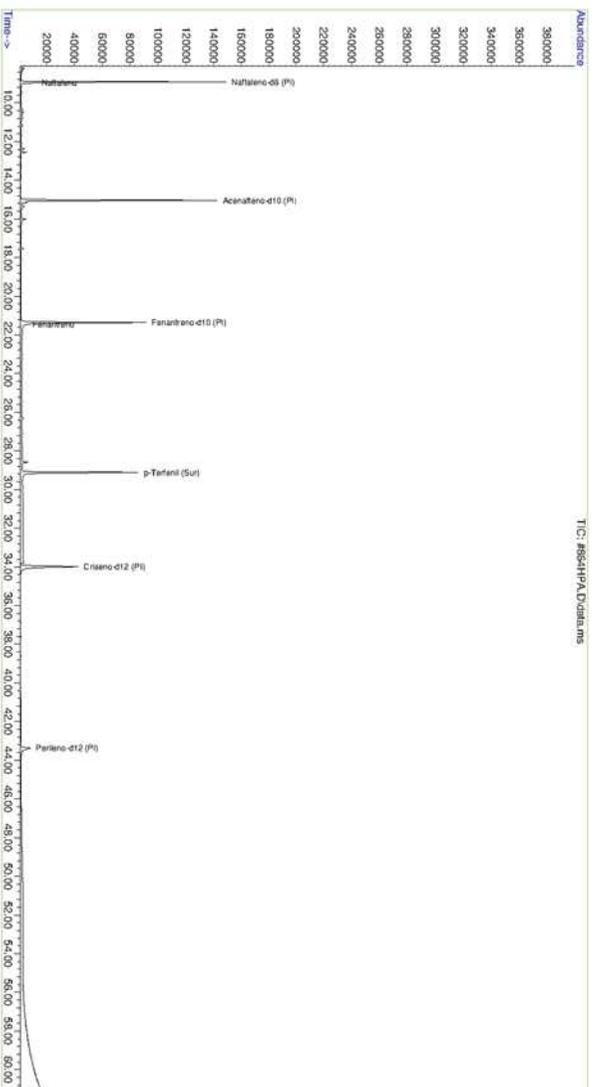
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	089BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,0	70,0
2-Metilnaftaleno	0,9	13,0	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,0	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,0	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,0	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,0	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,0	<0,2
Acenafteno	0,2	13,0	<0,2
Fluoreno	0,1	13,0	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,0	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,0	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,0	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,0	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,0	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,0	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,0	<0,3
Fenantreno	0,4	13,0	21,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,0	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,0	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,0	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,0	<0,4
Antraceno	0,2	13,0	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,0	<0,3
Pireno	0,2	13,0	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,0	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,0	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,0	<0,4
Criseno	0,4	13,0	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,0	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,0	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,0	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,0	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,0	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,0	<0,1
Perileno	0,1	13,0	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,0	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,0	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,0	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			91,6
Σ HPA			91,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			87
Umidade (%)			56,7
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

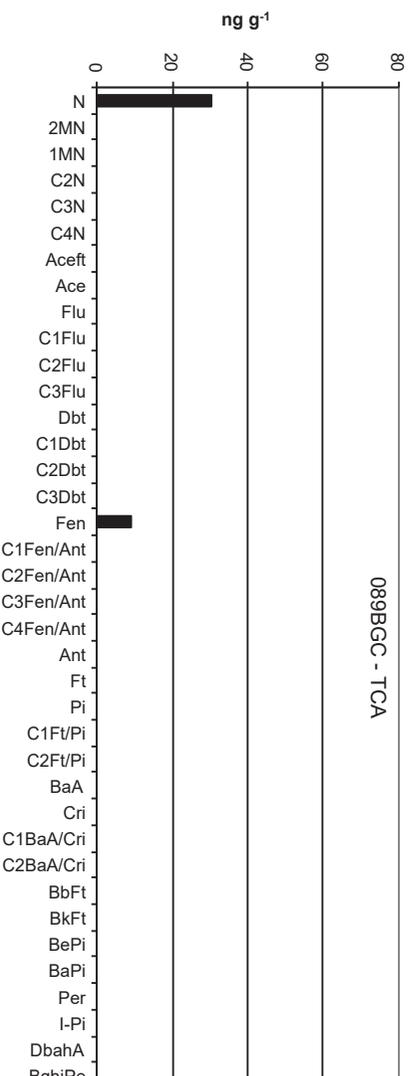
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

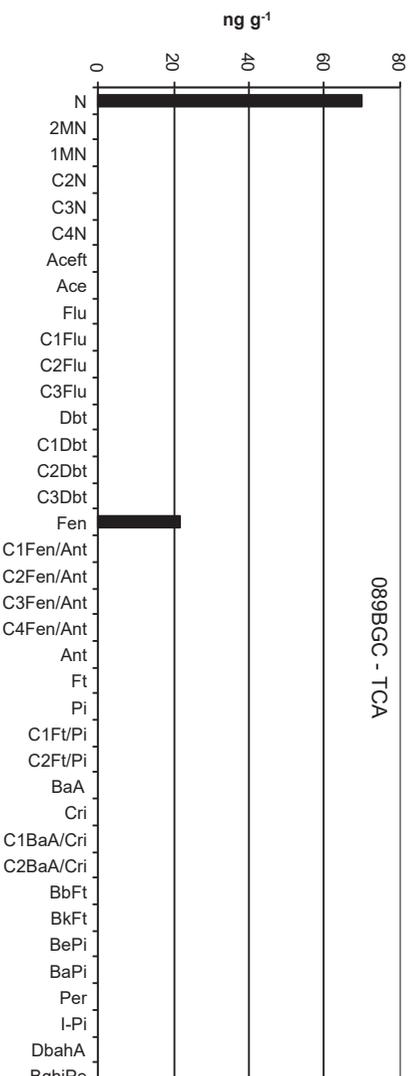
Amostra 089BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

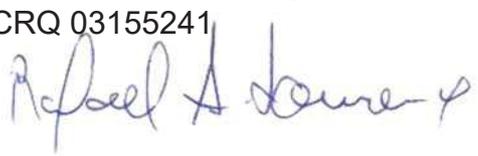


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	794/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	095BGC / 29727 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	09/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	095BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	32,6
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	6,0
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	10,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			42,8
Σ HPA			48,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			93
Umidade (%)			66,3
Lipídios (%)			15,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

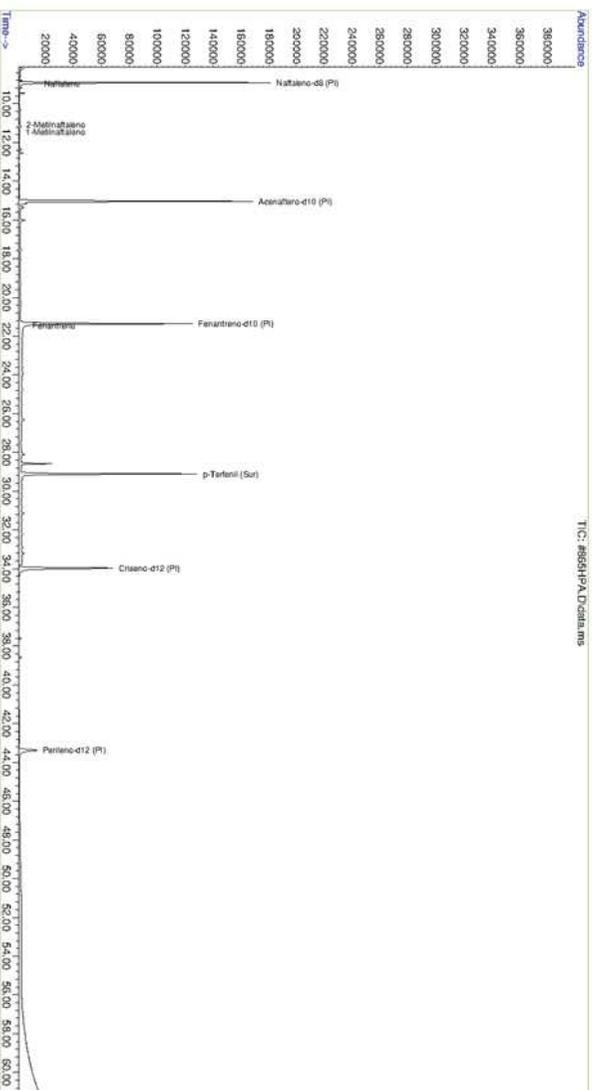
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	095BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,1	16,7	96,9
2-Metilnaftaleno	1,1	16,7	17,7
1-Metilnaftaleno	1,1	16,7	<16,7
C2-Naftaleno	1,1	16,7	<1,1
C3-Naftaleno	1,1	16,7	<1,1
C4-Naftaleno	1,1	16,7	<1,1
Acenaftileno	0,2	16,7	<0,2
Acenafteno	0,2	16,7	<0,2
Fluoreno	0,1	16,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	16,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	16,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	16,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	16,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	16,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	16,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	16,7	<0,3
Fenantreno	0,6	16,7	30,3
C1-Fenantreno-antraceno	0,6	16,7	<0,6
C2-Fenantreno-antraceno	0,6	16,7	<0,6
C3-Fenantreno-antraceno	0,6	16,7	<0,6
C4-Fenantreno-antraceno	0,6	16,7	<0,6
Antraceno	0,2	16,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	16,7	<0,3
Pireno	0,2	16,7	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	16,7	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	16,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,6	16,7	<0,6
Criseno	0,6	16,7	<0,6
C1-Criseno	0,6	16,7	<0,6
C2-Criseno	0,6	16,7	<0,6
Benzo(b)fluoranteno	0,3	16,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	16,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	16,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	16,7	<0,1
Perileno	0,1	16,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	16,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	16,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	16,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			127,2
Σ HPA			144,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			93
Umidade (%)			66,3
Lipídios (%)			15,0

TCA = Amostra de Gordura

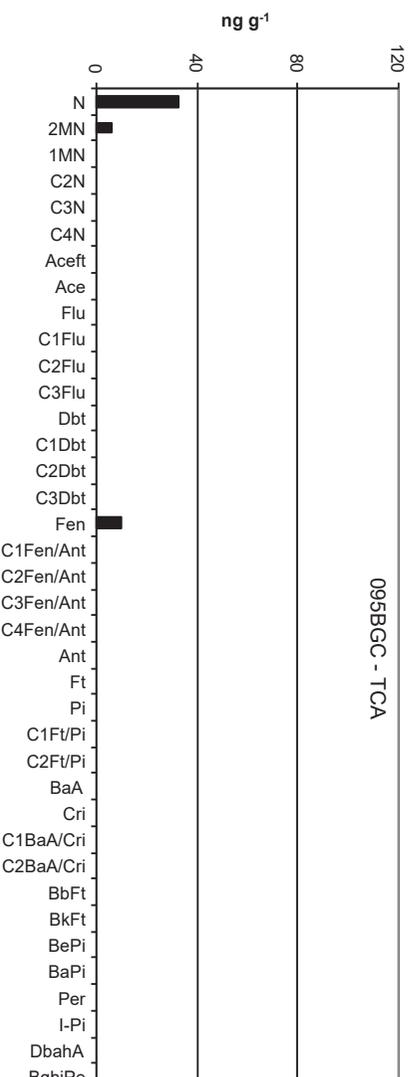
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

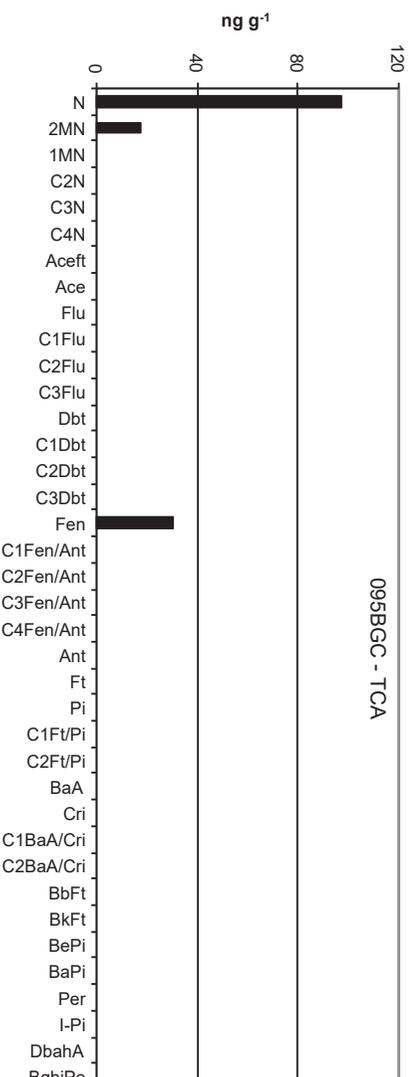
Amostra 095BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

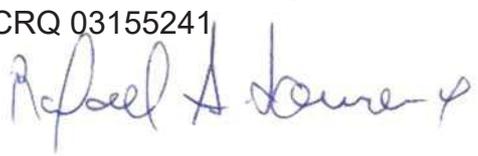


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	795/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	097BGC / 29728 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	09/02/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	097BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	22,6
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			22,6
Σ HPA			22,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			72
Umidade (%)			56,2
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

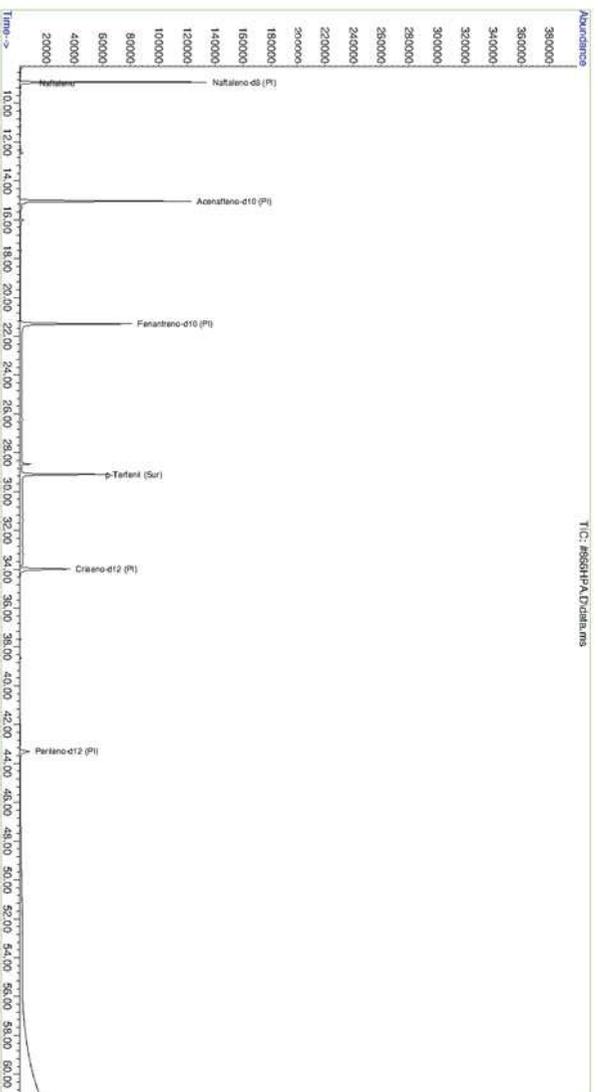
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	097BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	12,9	51,7
2-Metilnaftaleno	0,9	12,9	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	12,9	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	12,9	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	12,9	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	12,9	<0,9
Acenaftileno	0,2	12,9	<0,2
Acenafteno	0,2	12,9	<0,2
Fluoreno	0,1	12,9	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,9	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,9	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,9	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,9	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,9	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,9	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,9	<0,3
Fenantreno	0,4	12,9	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,9	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,9	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,9	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,9	<0,4
Antraceno	0,2	12,9	<0,2
Fluoranteno	0,3	12,9	<0,3
Pireno	0,2	12,9	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	12,9	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	12,9	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	12,9	<0,4
Criseno	0,4	12,9	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,9	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,9	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	12,9	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	12,9	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	12,9	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,9	<0,1
Perileno	0,1	12,9	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,9	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,9	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,9	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			51,7
Σ HPA			51,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			72
Umidade (%)			56,2
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

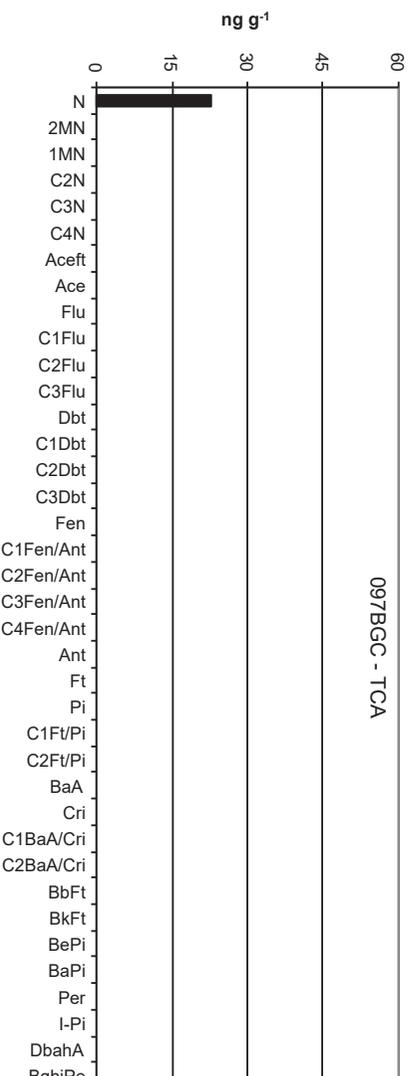
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

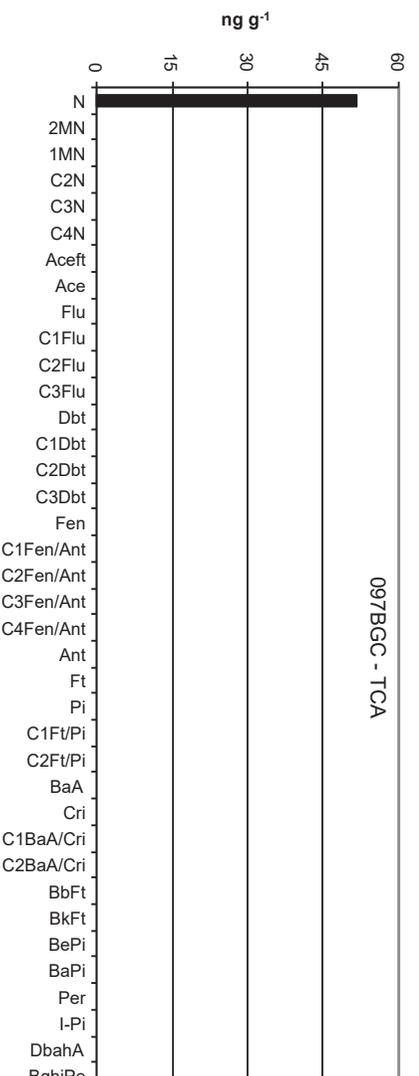
Amostra 097BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

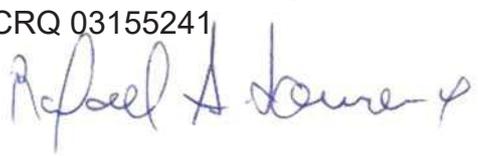


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	796/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	123BGC / 30399 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	03/04/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	123BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	180,9
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	7,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	7,2
Acenafteno	0,1	5,6	<5,6
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	78,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	10,7
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	11,0
Fluoranteno	0,1	5,6	54,9
Pireno	0,1	5,6	185,7
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	14,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	28,3
Criseno	0,2	5,6	27,0
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			573,4
Σ HPA			605,6
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			57,7
Lipídios (%)			28,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

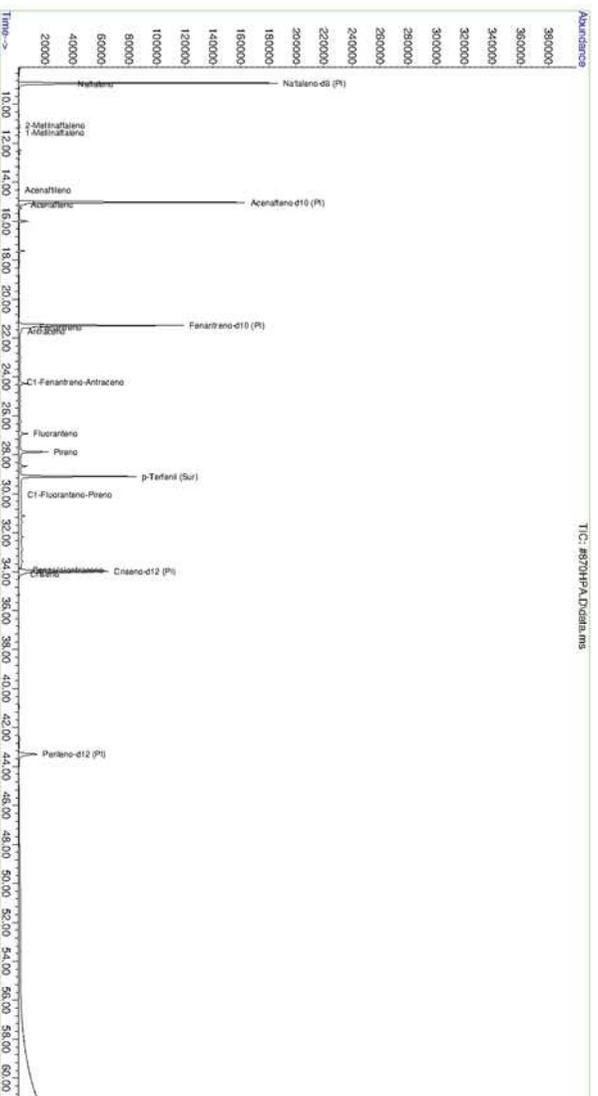
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	LD	LQ	123BGC
			TCA
Naftaleno	0,9	13,3	427,5
2-Metilnaftaleno	0,9	13,3	17,4
1-Metilnaftaleno	0,9	13,3	<13,3
C2-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,3	17,0
Acenafteno	0,2	13,3	<13,3
Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
Fenantreno	0,4	13,3	185,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	25,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
Antraceno	0,2	13,3	26,0
Fluoranteno	0,3	13,3	129,6
Pireno	0,2	13,3	438,8
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,3	33,4
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,3	66,9
Criseno	0,4	13,3	63,7
C1-Criseno	0,4	13,3	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,3	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,3	<0,1
Perileno	0,1	13,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1355,0
Σ HPA			1431,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			57,7
Lipídios (%)			28,0

TCA = Amostra de Gordura

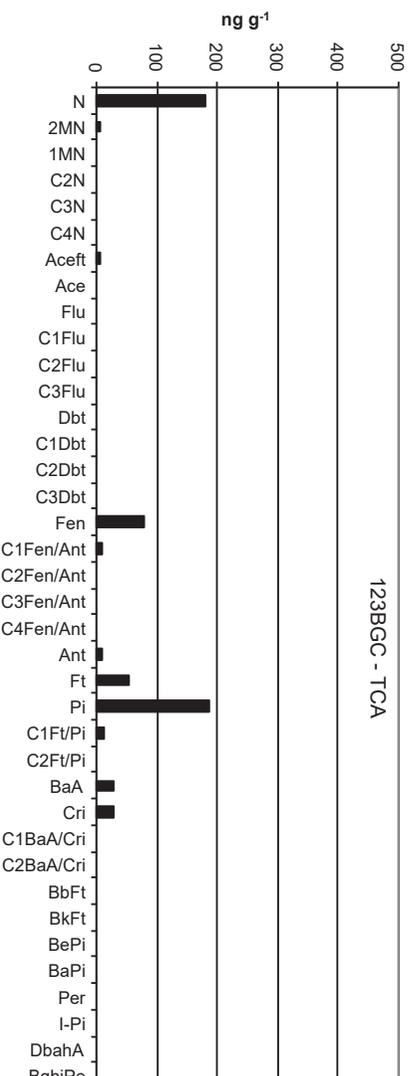
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

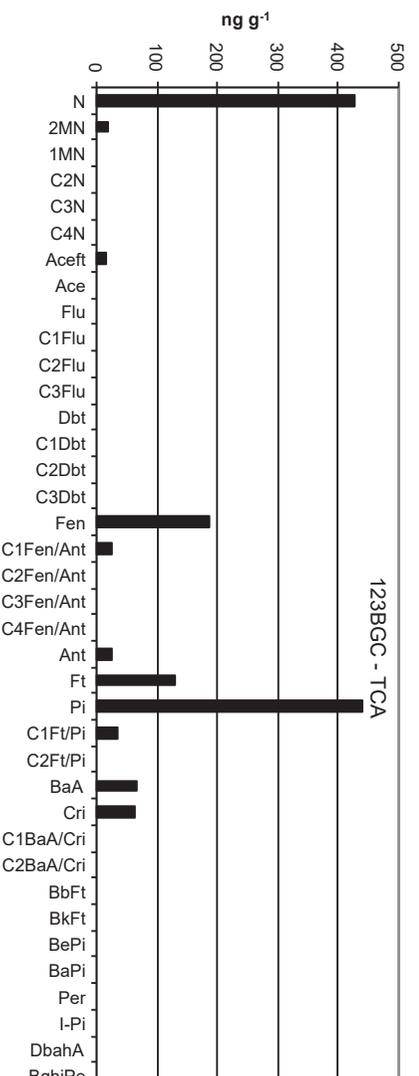
Amostra 123BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

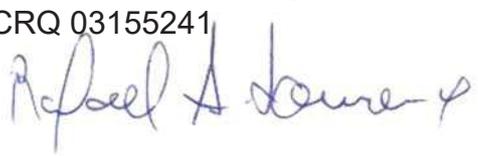


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	797/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	125BGC / 30444 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	10/04/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	LD	LQ	125BGC
			TCA
Naftaleno	0,4	5,6	214,2
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	9,6
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	6,3
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	8,5
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	103,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	64,5
Pireno	0,1	5,6	211,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	16,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	32,1
Criseno	0,2	5,6	22,6
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			656,8
Σ HPA			688,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			50
Umidade (%)			58,9
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

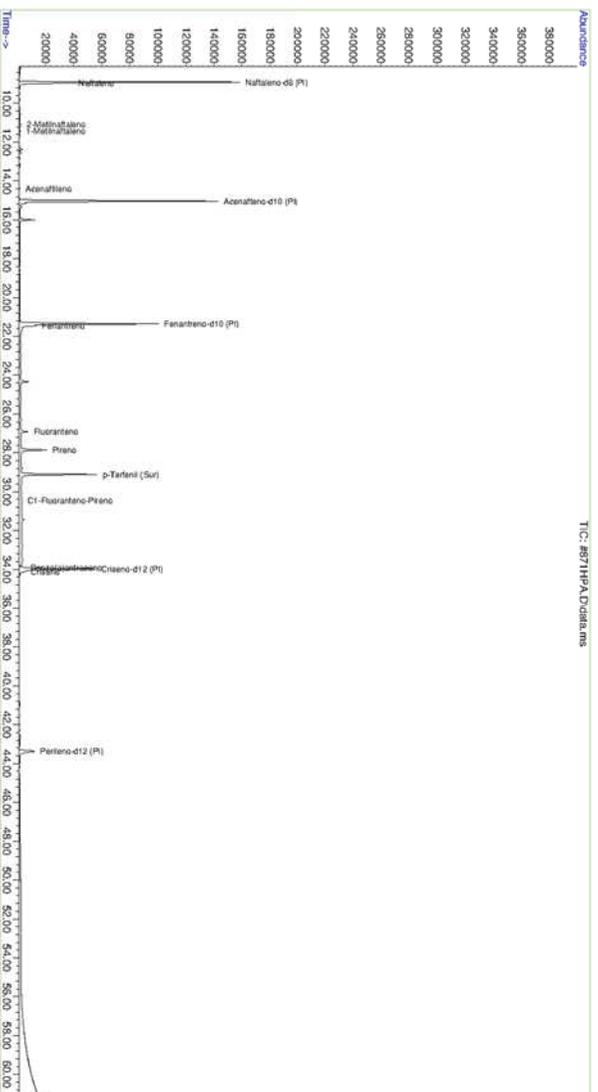
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	125BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,7	521,3
2-Metilnaftaleno	0,9	13,7	23,4
1-Metilnaftaleno	0,9	13,7	15,3
C2-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,7	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,7	20,8
Acenafteno	0,2	13,7	<0,2
Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,7	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,7	<0,3
Fenantreno	0,5	13,7	252,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	13,7	<0,5
Antraceno	0,2	13,7	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,7	157,1
Pireno	0,2	13,7	514,0
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	39,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	13,7	78,0
Criseno	0,5	13,7	55,1
C1-Criseno	0,5	13,7	<0,5
C2-Criseno	0,5	13,7	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,7	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,7	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,7	<0,1
Perileno	0,1	13,7	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,7	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,7	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,7	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1598,7
Σ HPA			1676,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			50
Umidade (%)			58,9
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

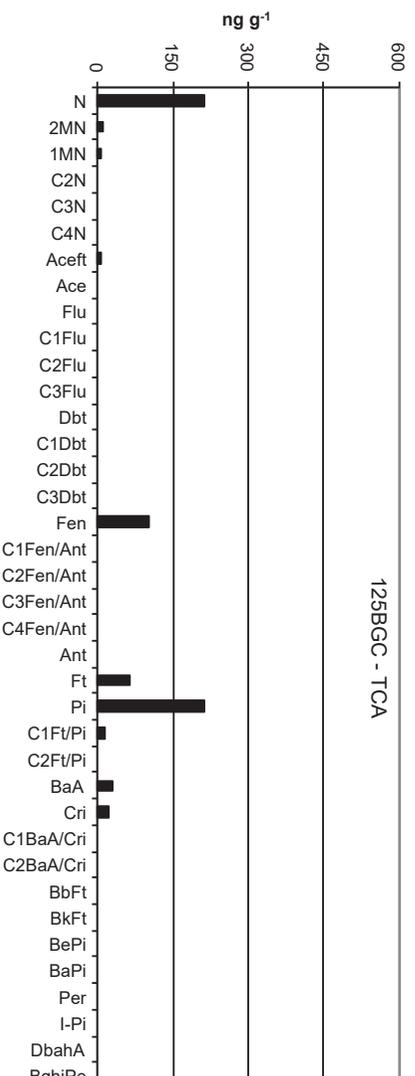
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

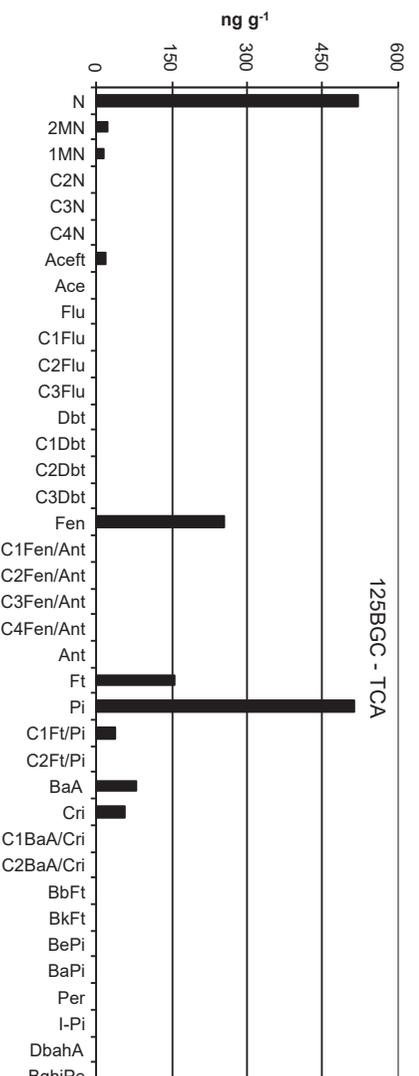
Amostra 125BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

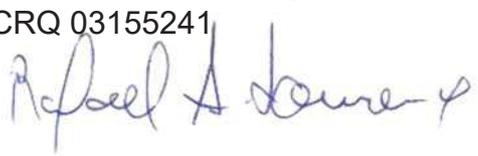


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	798/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	244BGC / 32793 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	05/04/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido			244BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	98,3
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	35,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	26,6
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	13,0
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			160,0
Σ HPA			173,0
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			53,6
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

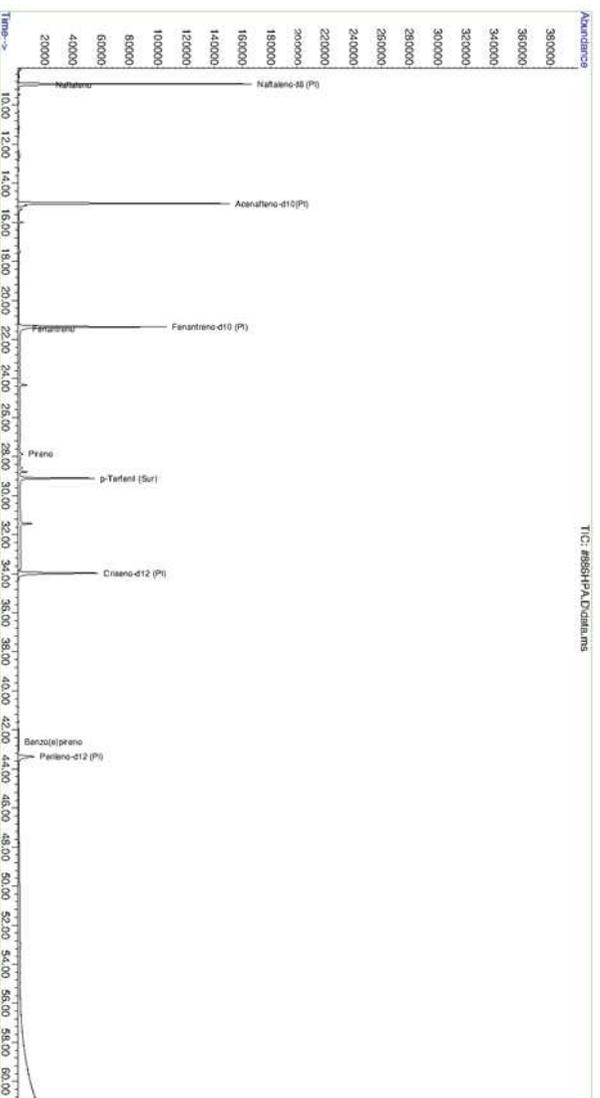
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			244BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,1	211,9
2-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,1	<0,2
Acenafteno	0,2	12,1	<0,2
Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,1	<0,3
Fenantreno	0,4	12,1	75,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
Antraceno	0,2	12,1	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Pireno	0,2	12,1	57,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,1	<0,4
Criseno	0,4	12,1	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,1	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,1	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,1	27,9
Benzo(a)pireno	0,1	12,1	<0,1
Perileno	0,1	12,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			345,0
Σ HPA			372,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			68
Umidade (%)			53,6
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

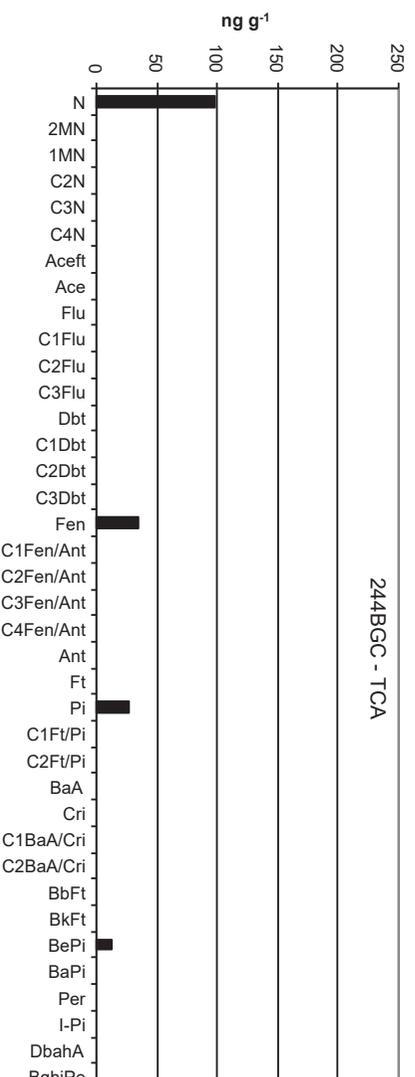
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

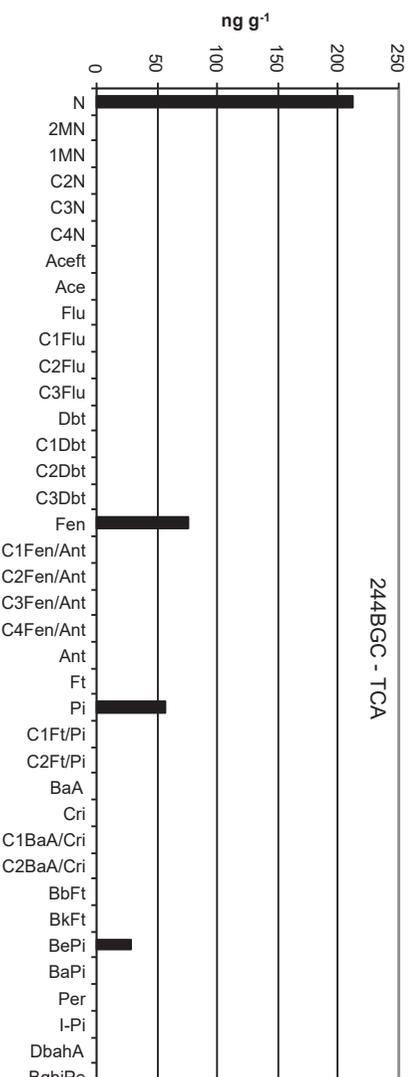
Amostra 244BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

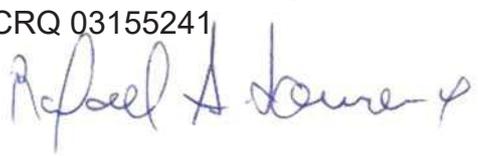


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	799/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	128BGC / 30510 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	16/04/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	128BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	222,6
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	105,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	51,9
Pireno	0,1	5,6	170,6
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	6,8
Criseno	0,2	5,6	11,6
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			568,8
Σ HPA			568,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			66
Umidade (%)			53,3
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

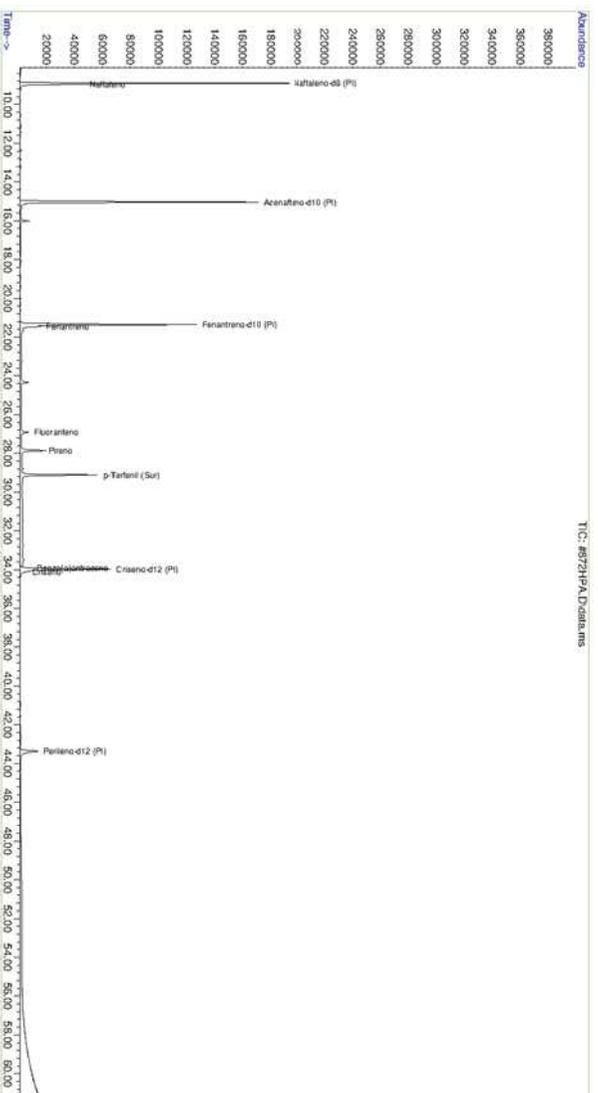
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	128BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,1	476,8
2-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,1	<0,2
Acenafteno	0,2	12,1	<0,2
Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
Fenantreno	0,4	12,1	225,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
Antraceno	0,2	12,1	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,1	111,2
Pireno	0,2	12,1	365,5
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,1	14,5
Criseno	0,4	12,1	24,7
C1-Criseno	0,4	12,1	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,1	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,1	<0,1
Perileno	0,1	12,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1218,5
Σ HPA			1218,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			66
Umidade (%)			53,3
Lipídios (%)			8,0

TCA = Amostra de Gordura

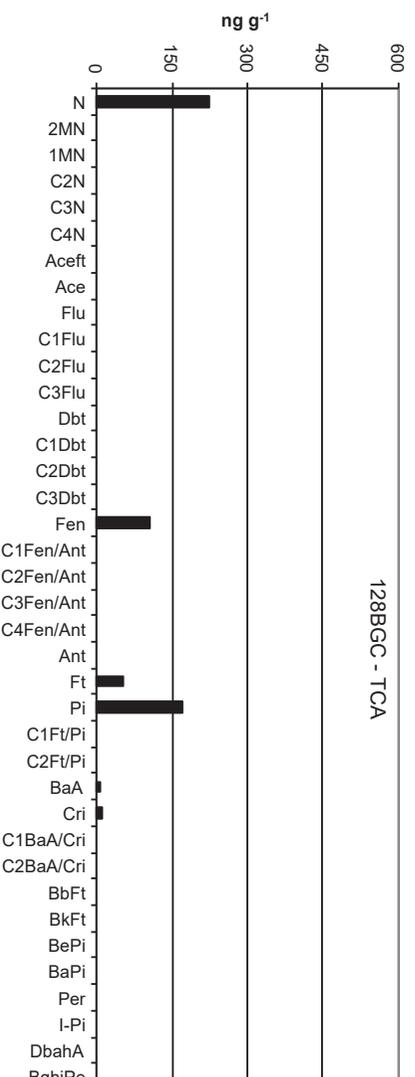
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

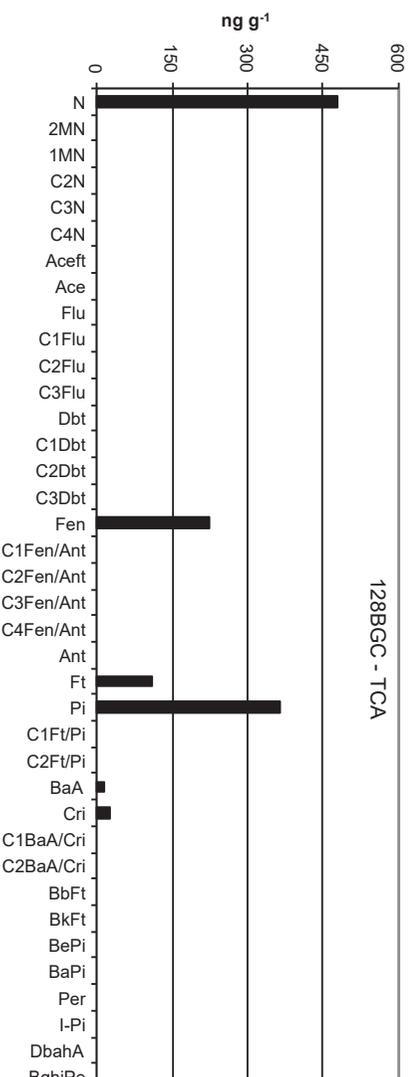
Amostra 128BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

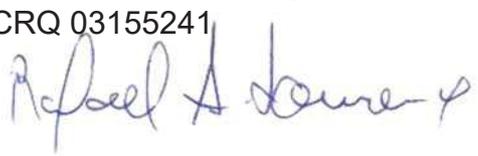


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	800/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	143BGC / 30672 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	20/07/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	143BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	281,7
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	10,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	7,2
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	11,4
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	192,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	17,9
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	34,0
Fluoranteno	0,1	5,6	104,6
Pireno	0,1	5,6	365,0
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	27,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	74,6
Criseno	0,2	5,6	58,0
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	81,2
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	117,6
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			1239,4
Σ HPA			1383,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			52,4
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

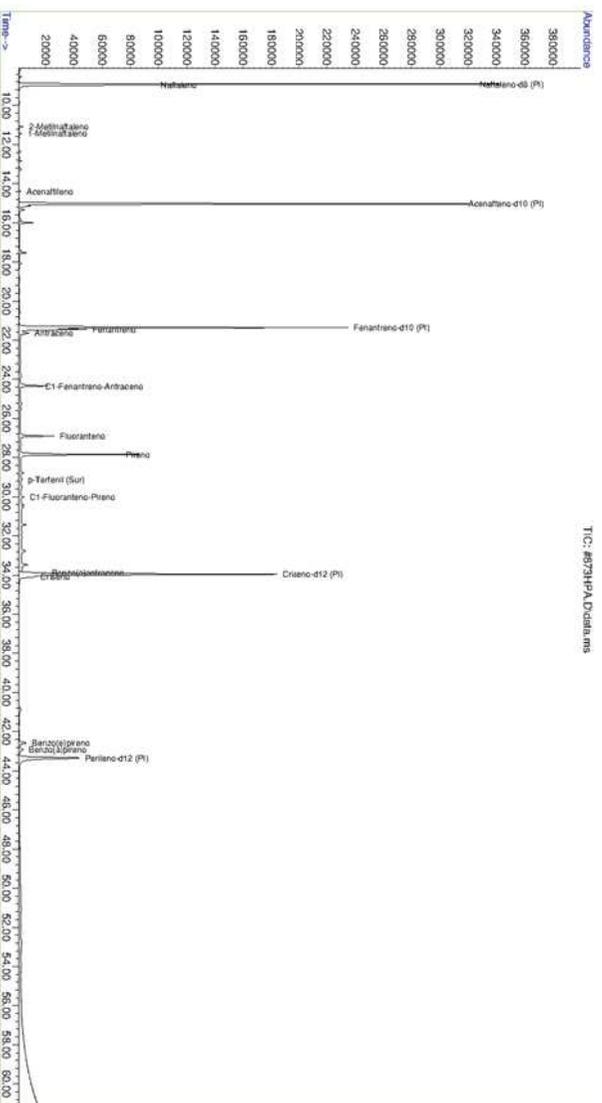
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			143BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,8	591,5
2-Metilnaftaleno	0,8	11,8	21,7
1-Metilnaftaleno	0,8	11,8	15,0
C2-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,8	24,0
Acenafteno	0,2	11,8	<0,2
Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
Fenantreno	0,4	11,8	404,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	37,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
Antraceno	0,2	11,8	71,4
Fluoranteno	0,2	11,8	219,7
Pireno	0,2	11,8	766,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,8	57,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,8	156,5
Criseno	0,4	11,8	121,7
C1-Criseno	0,4	11,8	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,8	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,8	170,5
Benzo(a)pireno	0,1	11,8	247,0
Perileno	0,1	11,8	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,8	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,8	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			2602,3
Σ HPA			2904,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			67
Umidade (%)			52,4
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

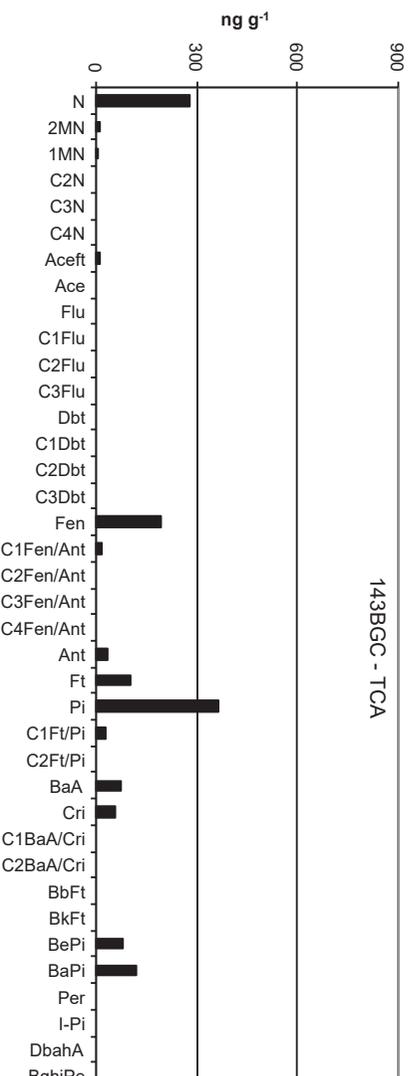
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

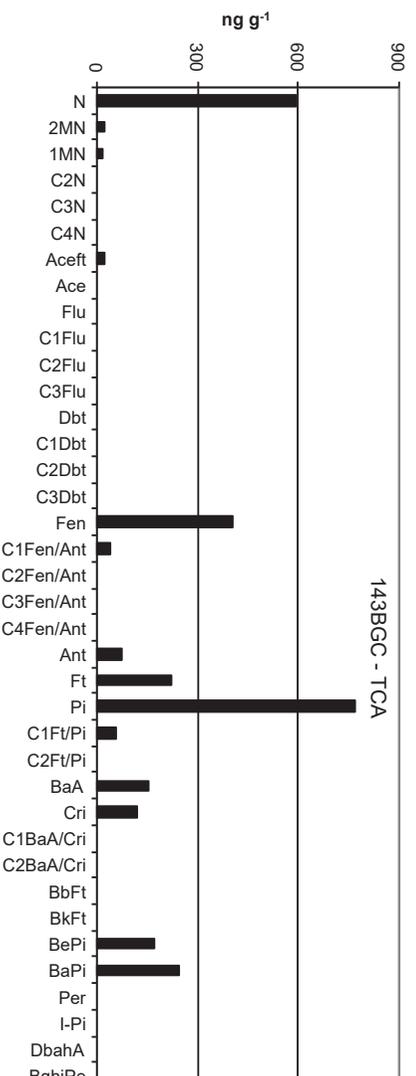
Amostra 143BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al, 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

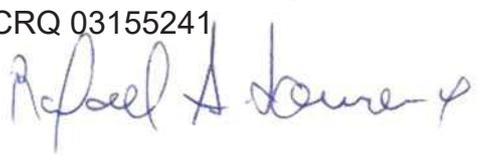


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	801/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	173BGC / 30980 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	06/09/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	173BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	170,9
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	7,5
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	27,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	9,7
Pireno	0,1	5,6	13,7
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			221,9
Σ HPA			229,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			74
Umidade (%)			52,9
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

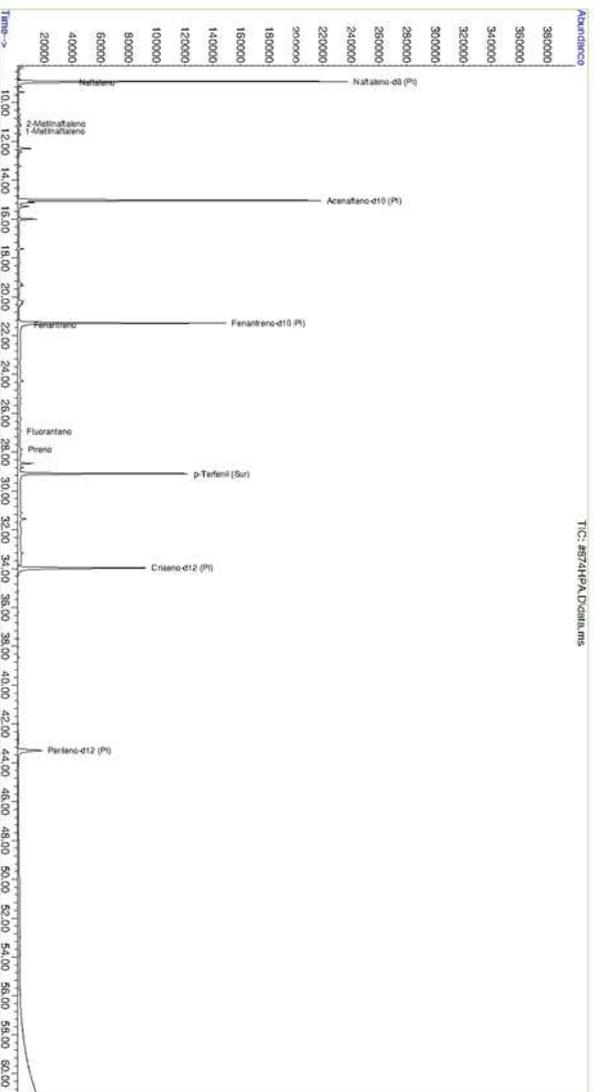
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			173BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,9	362,5
2-Metilnaftaleno	0,8	11,9	16,0
1-Metilnaftaleno	0,8	11,9	<11,9
C2-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,9	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,9	<0,2
Acenafteno	0,2	11,9	<0,2
Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,9	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,9	<0,2
Fenantreno	0,4	11,9	58,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,9	<0,4
Antraceno	0,2	11,9	<0,2
Fluoranteno	0,2	11,9	20,6
Pireno	0,2	11,9	29,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,9	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,9	<0,4
Criseno	0,4	11,9	<0,4
C1-Criseno	0,4	11,9	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,9	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,9	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	11,9	<0,1
Perileno	0,1	11,9	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,9	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,9	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,9	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			470,7
Σ HPA			486,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			74
Umidade (%)			52,9
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

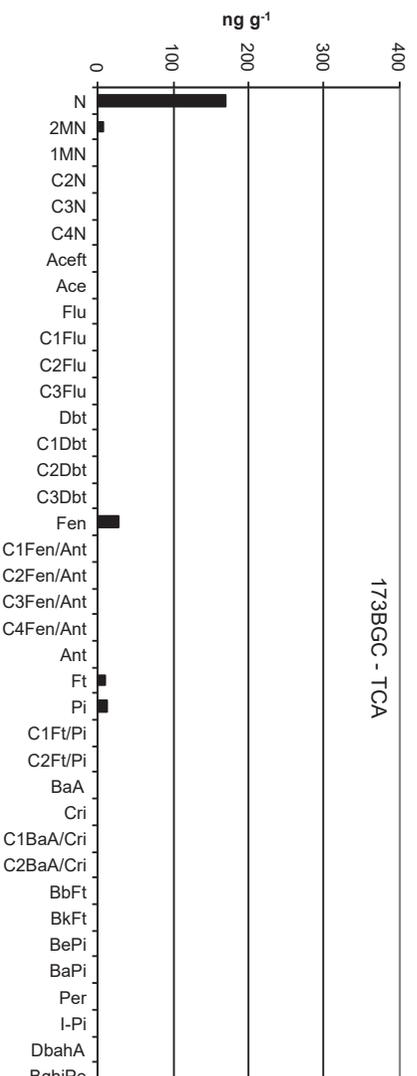
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

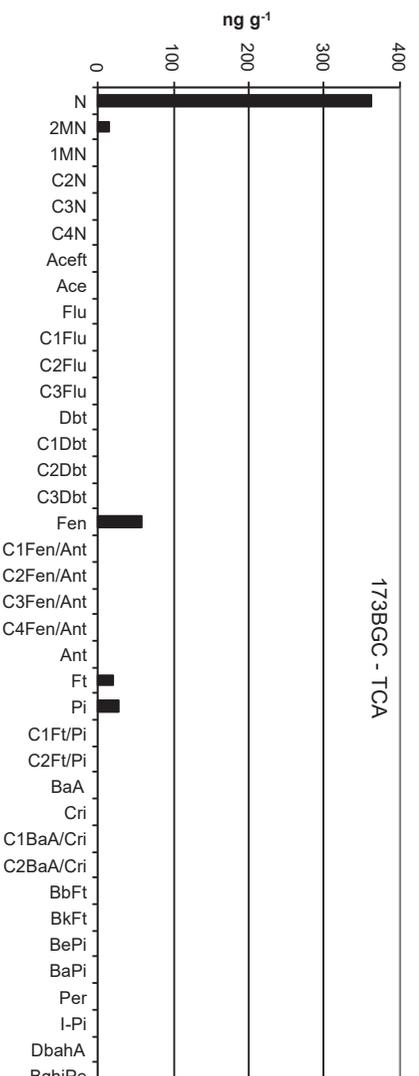
Amostra 173BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

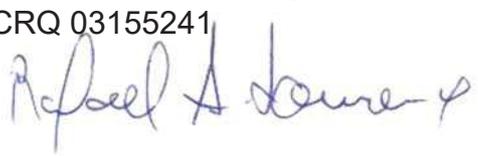


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	802/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	175BGC / 31210 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	01/10/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	175BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	180,8
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	31,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	9,7
Pireno	0,1	5,6	13,6
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			235,4
Σ HPA			235,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			74
Umidade (%)			61,0
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

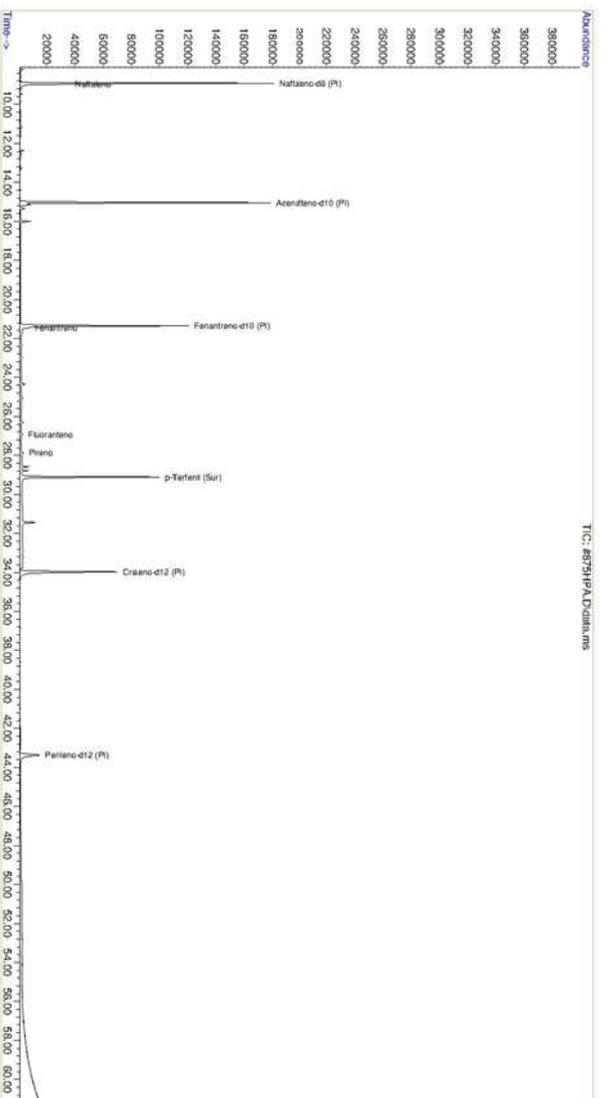
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	175BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,0	14,4	463,9
2-Metilnaftaleno	1,0	14,4	<1,0
1-Metilnaftaleno	1,0	14,4	<1,0
C2-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
C3-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
C4-Naftaleno	1,0	14,4	<1,0
Acenaftileno	0,2	14,4	<0,2
Acenafteno	0,2	14,4	<0,2
Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	14,4	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	14,4	<0,3
Fenantreno	0,5	14,4	80,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C2-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C3-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
C4-Fenantreno-antraceno	0,5	14,4	<0,5
Antraceno	0,2	14,4	<0,2
Fluoranteno	0,3	14,4	24,8
Pireno	0,2	14,4	34,8
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	14,4	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,5	14,4	<0,5
Criseno	0,5	14,4	<0,5
C1-Criseno	0,5	14,4	<0,5
C2-Criseno	0,5	14,4	<0,5
Benzo(b)fluoranteno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	14,4	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	14,4	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	14,4	<0,1
Perileno	0,1	14,4	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	14,4	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	14,4	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	14,4	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			603,8
Σ HPA			603,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			74
Umidade (%)			61,0
Lipídios (%)			2,0

TCA = Amostra de Gordura

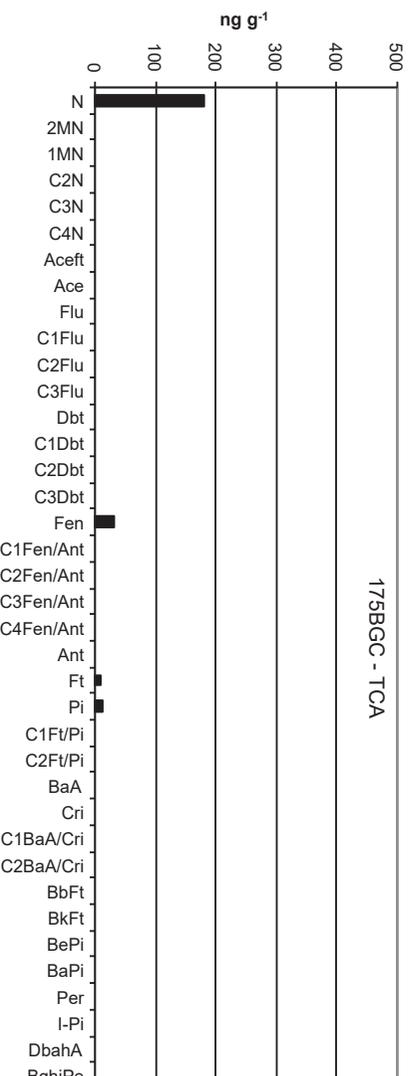
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

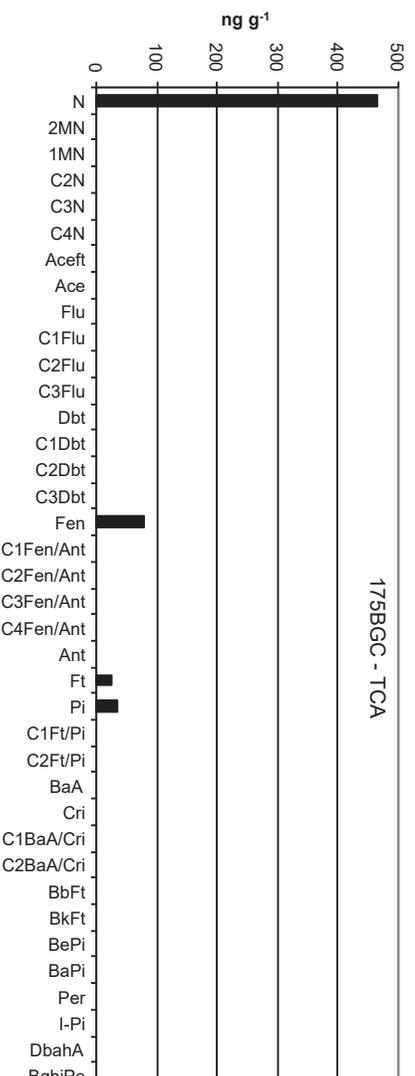
Amostra 175BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

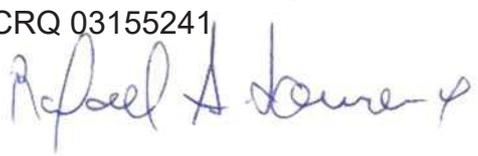


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	803/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	176BGC / 31210 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	01/10/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	16/10/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	176BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	192,1
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	7,7
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<5,6
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	62,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	33,6
Pireno	0,1	5,6	99,5
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	32,3
Criseno	0,2	5,6	24,9
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			445,1
Σ HPA			452,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			81
Umidade (%)			47,1
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

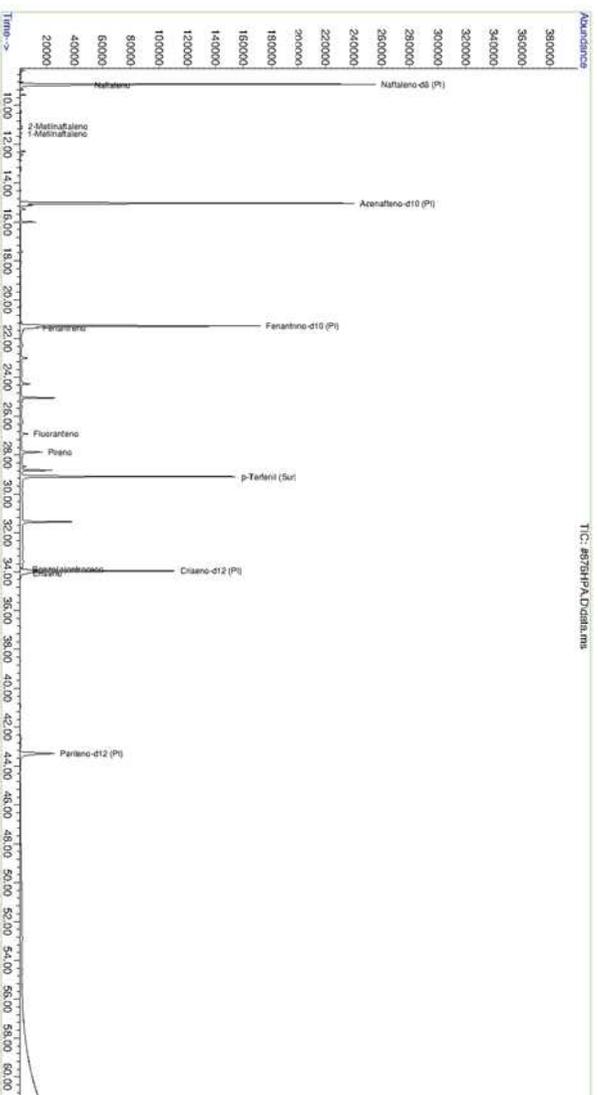
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	176BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,7	10,6	362,9
2-Metilnaftaleno	0,7	10,6	14,5
1-Metilnaftaleno	0,7	10,6	<10,6
C2-Naftaleno	0,7	10,6	<0,7
C3-Naftaleno	0,7	10,6	<0,7
C4-Naftaleno	0,7	10,6	<0,7
Acenaftileno	0,1	10,6	<0,1
Acenafteno	0,1	10,6	<0,1
Fluoreno	0,1	10,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	10,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	10,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	10,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	10,6	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	10,6	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	10,6	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	10,6	<0,2
Fenantreno	0,4	10,6	118,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	10,6	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	10,6	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	10,6	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	10,6	<0,4
Antraceno	0,1	10,6	<0,1
Fluoranteno	0,2	10,6	63,5
Pireno	0,1	10,6	187,9
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	10,6	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	10,6	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	10,6	61,0
Criseno	0,4	10,6	47,1
C1-Criseno	0,4	10,6	<0,4
C2-Criseno	0,4	10,6	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	10,6	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	10,6	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	10,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	10,6	<0,1
Perileno	0,1	10,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	10,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	10,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	10,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			840,8
Σ HPA			855,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			81
Umidade (%)			47,1
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

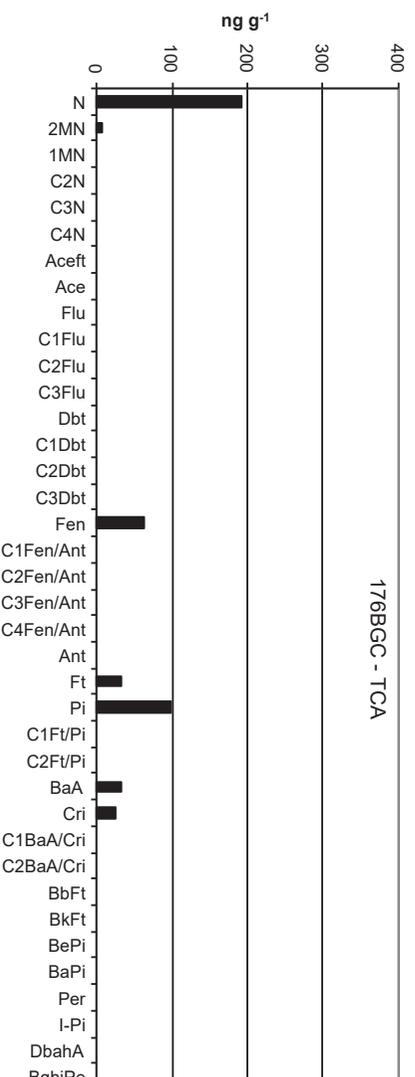
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

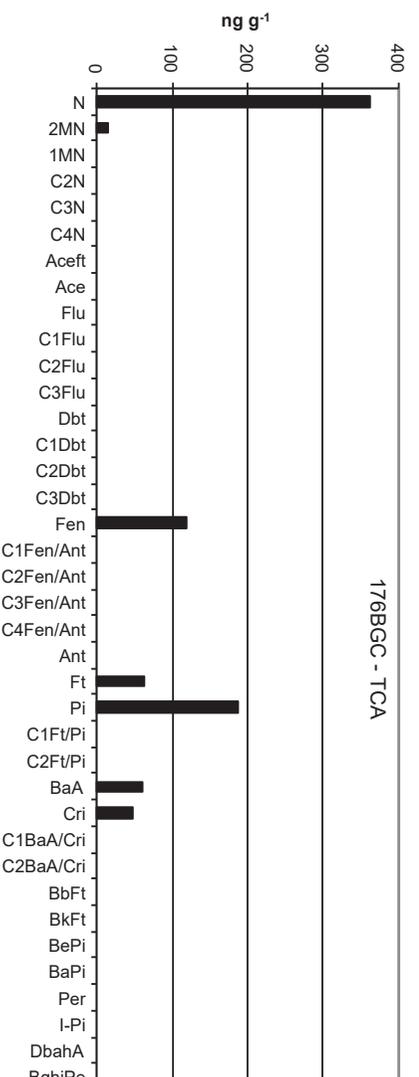
Amostra 176BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

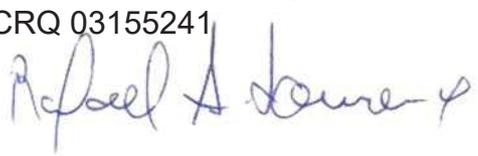


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	804/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	188BGC / 31398 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	15/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	188BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	202,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	9,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	6,1
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	71,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	29,0
Pireno	0,1	5,6	79,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	6,0
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			388,0
Σ HPA			403,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			44,1
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

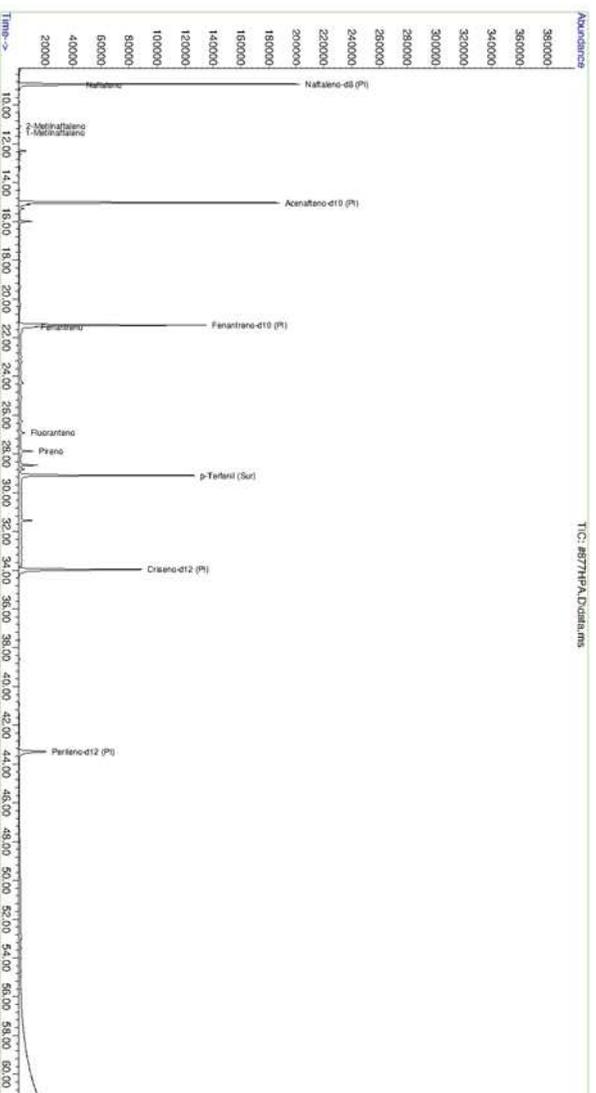
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	188BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,7	10,1	362,2
2-Metilnaftaleno	0,7	10,1	16,8
1-Metilnaftaleno	0,7	10,1	10,9
C2-Naftaleno	0,7	10,1	<0,7
C3-Naftaleno	0,7	10,1	<0,7
C4-Naftaleno	0,7	10,1	<0,7
Acenaftileno	0,1	10,1	<0,1
Acenafteno	0,1	10,1	<0,1
Fluoreno	0,1	10,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	10,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	10,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	10,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	10,1	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	10,1	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	10,1	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	10,1	<0,2
Fenantreno	0,3	10,1	127,9
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	10,1	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	10,1	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	10,1	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	10,1	<0,3
Antraceno	0,1	10,1	<0,1
Fluoranteno	0,2	10,1	51,9
Pireno	0,1	10,1	141,8
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	10,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	10,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	10,1	<0,3
Criseno	0,3	10,1	10,7
C1-Criseno	0,3	10,1	<0,3
C2-Criseno	0,3	10,1	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	10,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	10,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	10,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	10,1	<0,1
Perileno	0,1	10,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	10,1	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	10,1	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	10,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			694,5
Σ HPA			722,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			85
Umidade (%)			44,1
Lipídios (%)			14,0

TCA = Amostra de Gordura

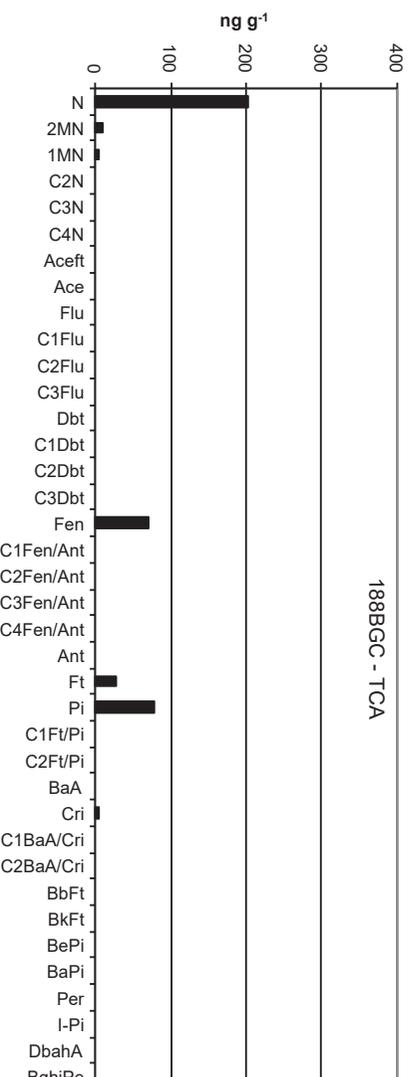
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

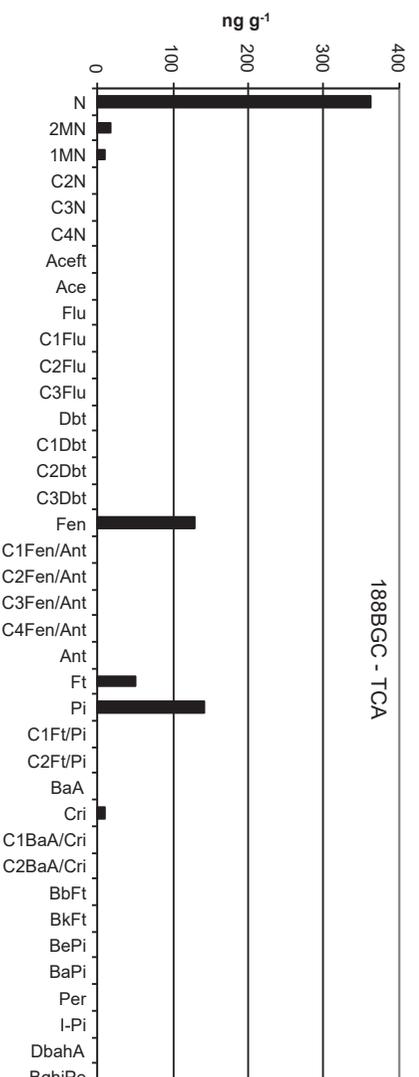
Amostra 188BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

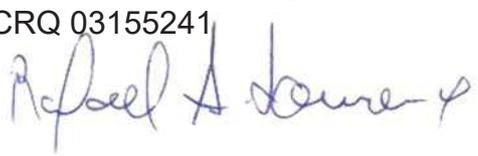


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	805/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	193BGC / 31416 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	17/11/2017
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	193BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	189,0
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	51,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	18,8
Pireno	0,1	5,6	47,6
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			306,5
Σ HPA			306,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			36,6
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

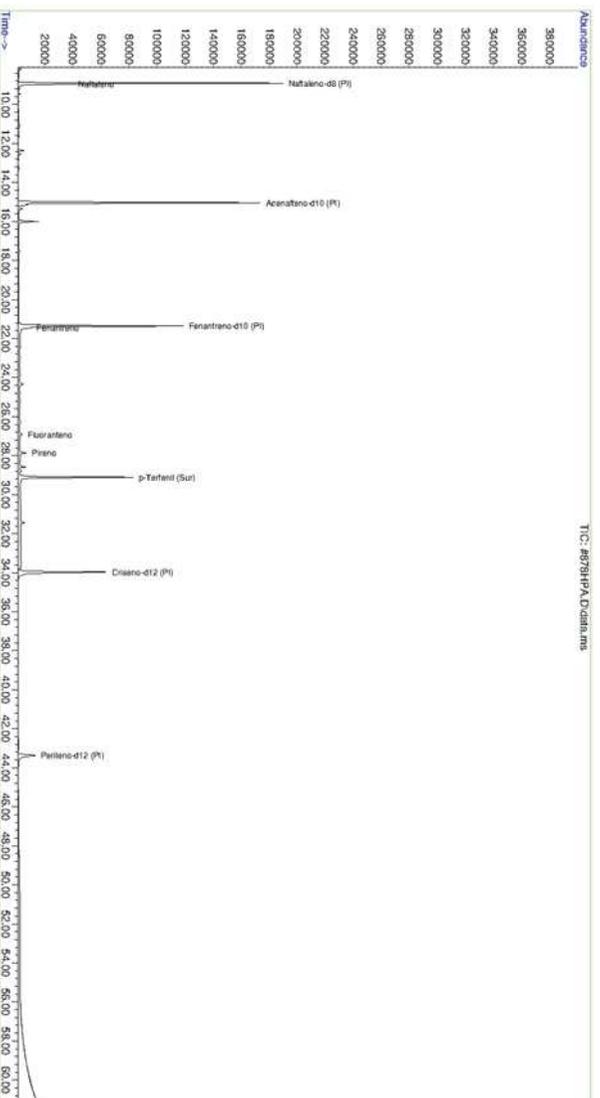
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	193BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,6	8,9	298,0
2-Metilnaftaleno	0,6	8,9	<0,6
1-Metilnaftaleno	0,6	8,9	<0,6
C2-Naftaleno	0,6	8,9	<0,6
C3-Naftaleno	0,6	8,9	<0,6
C4-Naftaleno	0,6	8,9	<0,6
Acenaftileno	0,1	8,9	<0,1
Acenafteno	0,1	8,9	<0,1
Fluoreno	0,1	8,9	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	8,9	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	8,9	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	8,9	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	8,9	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	8,9	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	8,9	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	8,9	<0,2
Fenantreno	0,3	8,9	80,6
C1-Fenantreno-antraceno	0,3	8,9	<0,3
C2-Fenantreno-antraceno	0,3	8,9	<0,3
C3-Fenantreno-antraceno	0,3	8,9	<0,3
C4-Fenantreno-antraceno	0,3	8,9	<0,3
Antraceno	0,1	8,9	<0,1
Fluoranteno	0,2	8,9	29,6
Pireno	0,1	8,9	75,0
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	8,9	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	8,9	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,3	8,9	<0,3
Criseno	0,3	8,9	<0,3
C1-Criseno	0,3	8,9	<0,3
C2-Criseno	0,3	8,9	<0,3
Benzo(b)fluoranteno	0,2	8,9	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	8,9	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	8,9	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	8,9	<0,1
Perileno	0,1	8,9	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	8,9	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	8,9	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	8,9	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			483,0
Σ HPA			483,0
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			62
Umidade (%)			36,6
Lipídios (%)			13,0

TCA = Amostra de Gordura

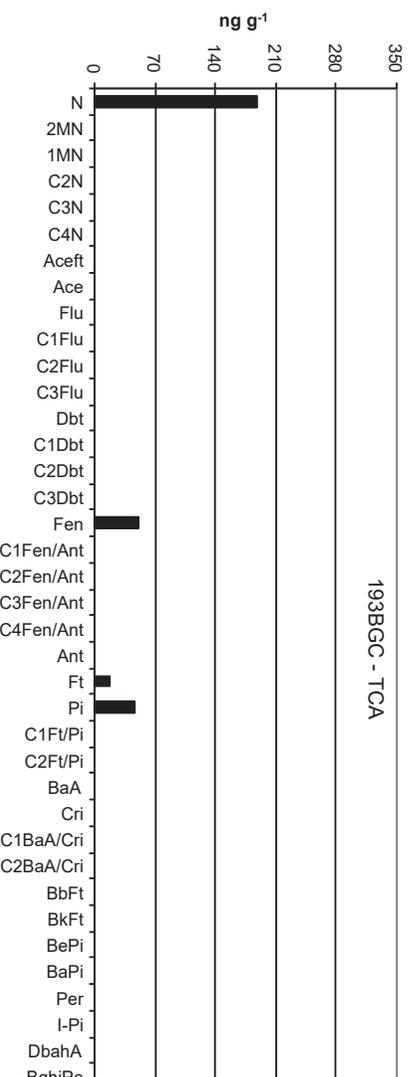
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

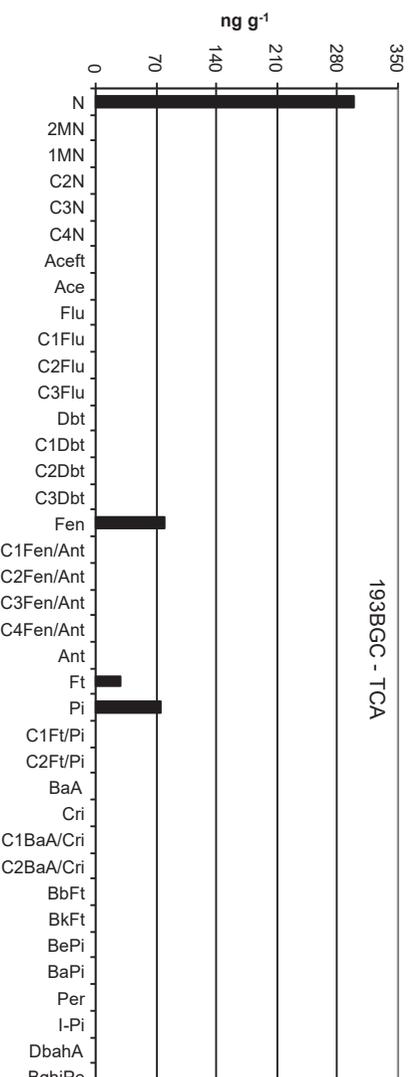
Amostra 193BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

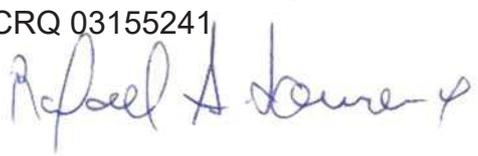


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	806/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	208BGC / 32440 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	22/01/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	208BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	76,7
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	51,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	59,9
Fluoranteno	0,1	5,6	21,8
Pireno	0,1	5,6	69,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			278,7
Σ HPA			278,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			82
Umidade (%)			50,3
Lipídios (%)			9,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

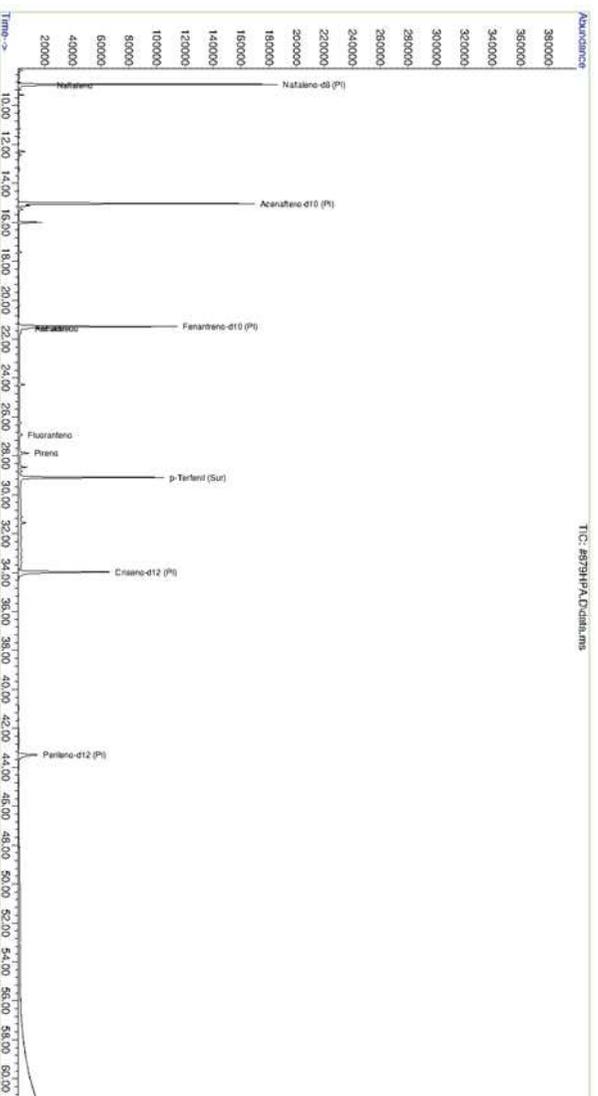
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	208BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,3	154,3
2-Metilnaftaleno	0,8	11,3	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	11,3	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	11,3	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,3	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,3	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,3	<0,2
Acenafteno	0,2	11,3	<0,2
Fluoreno	0,1	11,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,3	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,3	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,3	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,3	<0,2
Fenantreno	0,4	11,3	102,9
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,3	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,3	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,3	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,3	<0,4
Antraceno	0,2	11,3	120,4
Fluoranteno	0,2	11,3	43,7
Pireno	0,2	11,3	139,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,3	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,3	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,3	<0,4
Criseno	0,4	11,3	<0,4
C1-Criseno	0,4	11,3	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,3	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,3	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,3	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	11,3	<0,1
Perileno	0,1	11,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			560,4
Σ HPA			560,4
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			82
Umidade (%)			50,3
Lipídios (%)			9,0

TCA = Amostra de Gordura

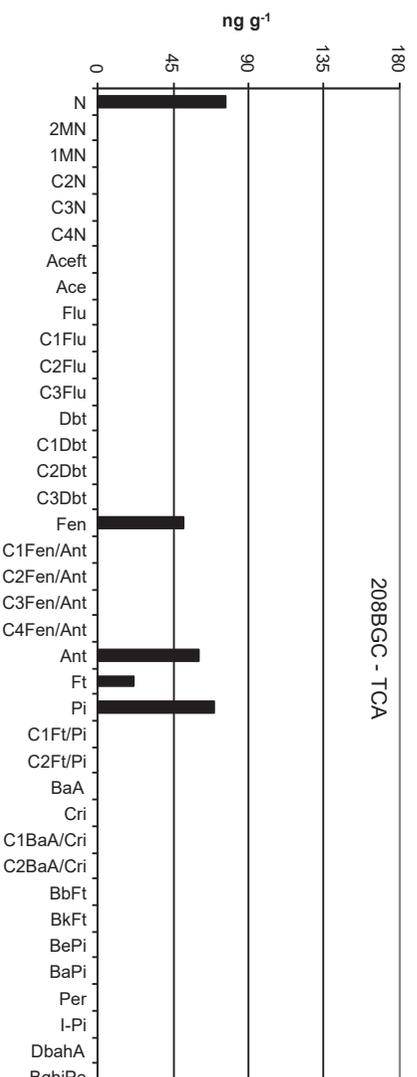
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

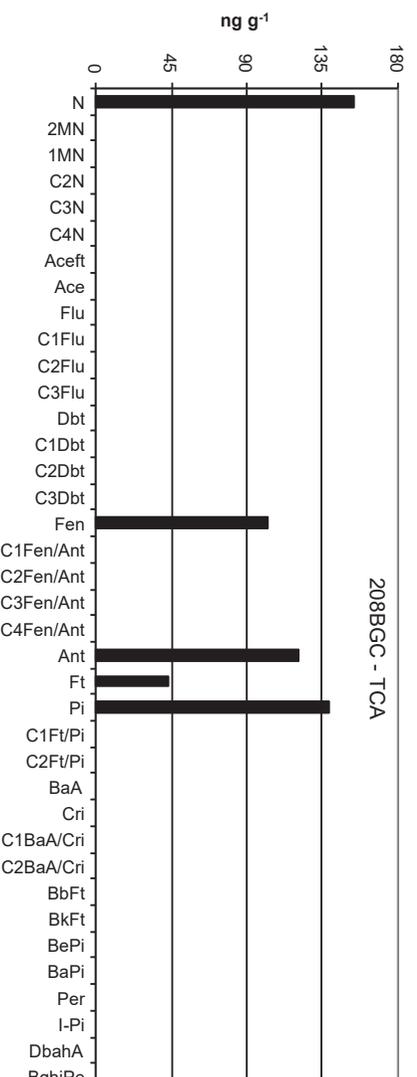
Amostra 208BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P., Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

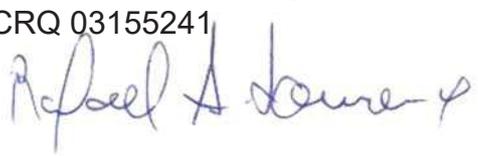


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	807/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	209BGC / 32440 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	22/01/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	209BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	49,6
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	29,5
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	34,4
Fluoranteno	0,1	5,6	13,7
Pireno	0,1	5,6	40,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			167,5
Σ HPA			167,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			92
Umidade (%)			53,3
Lipídios (%)			4,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

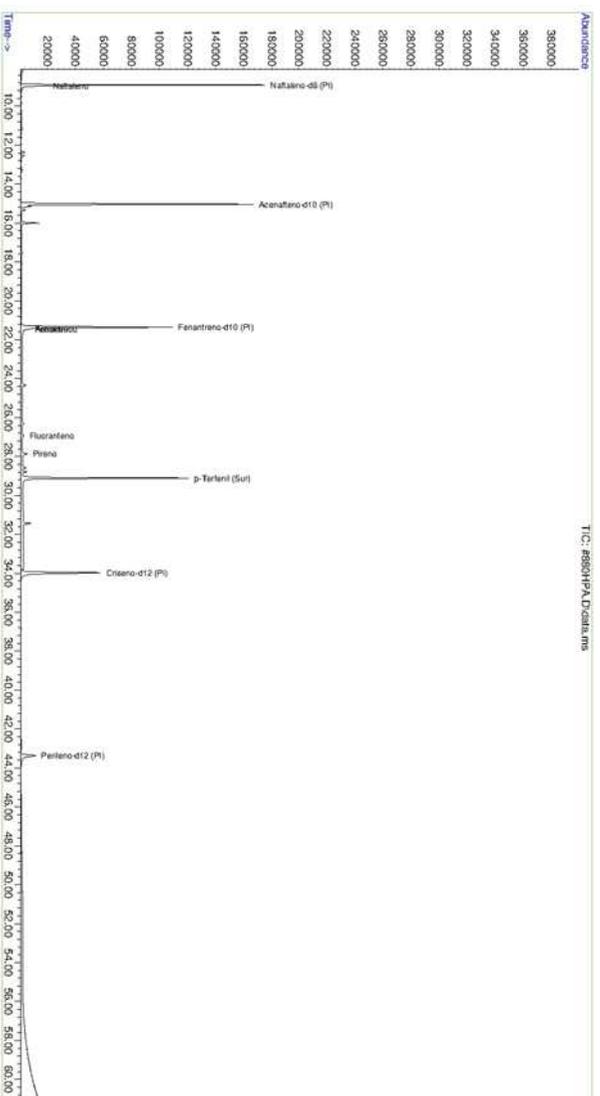
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			209BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,1	106,3
2-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,1	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,1	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,1	<0,2
Acenafteno	0,2	12,1	<0,2
Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,1	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	12,1	<0,2
Fenantreno	0,4	12,1	63,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,1	<0,4
Antraceno	0,2	12,1	73,6
Fluoranteno	0,2	12,1	29,3
Pireno	0,2	12,1	86,5
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,1	<0,4
Criseno	0,4	12,1	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,1	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,1	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,1	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,1	<0,1
Perileno	0,1	12,1	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,1	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,1	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,1	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			358,9
Σ HPA			358,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			92
Umidade (%)			53,3
Lipídios (%)			4,0

TCA = Amostra de Gordura

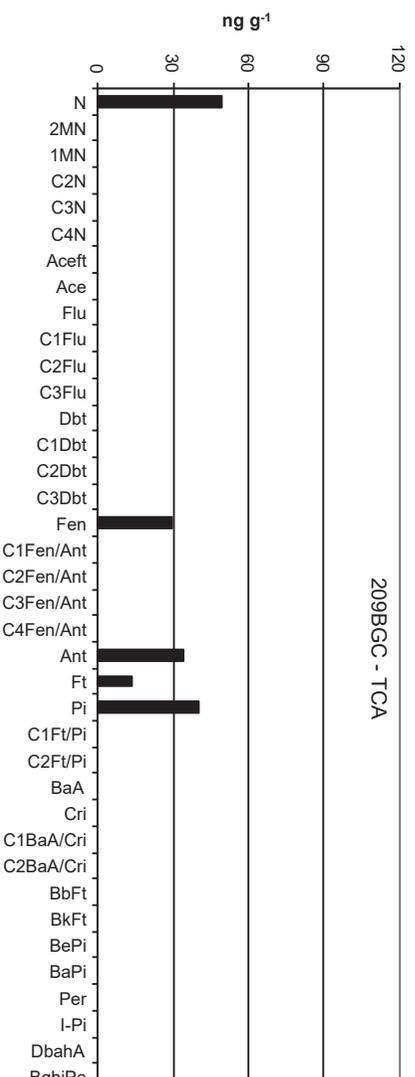
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

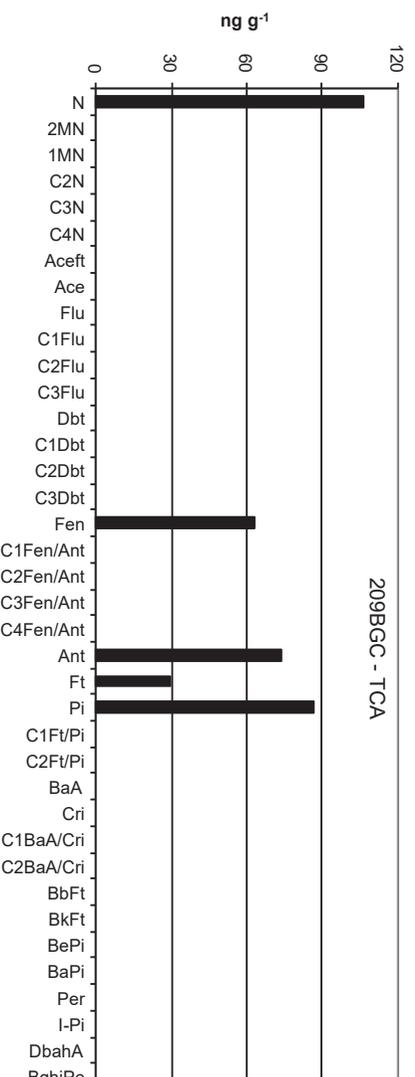
Amostra 209BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

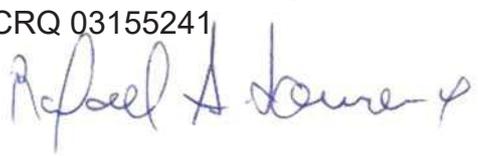


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	808/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	215BGC / 32626 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	08/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	LD	LQ	215BGC
			TCA
Naftaleno	0,4	5,6	53,7
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	51,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	23,5
Pireno	0,1	5,6	72,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			200,8
Σ HPA			200,8
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			52,5
Lipídios (%)			22,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

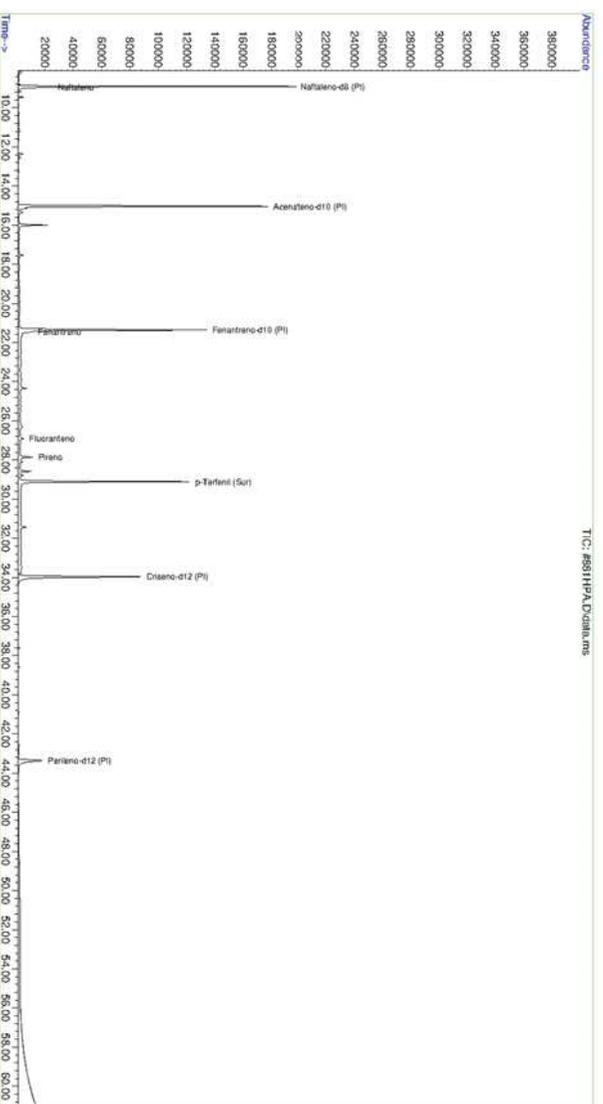
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			215BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	11,8	113,0
2-Metilnaftaleno	0,8	11,8	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	11,8	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	11,8	<0,8
Acenaftileno	0,2	11,8	<0,2
Acenafteno	0,2	11,8	<0,2
Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	11,8	<0,1
Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C1-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C2-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
C3-Dibenzotiofeno	0,2	11,8	<0,2
Fenantreno	0,4	11,8	108,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	11,8	<0,4
Antraceno	0,2	11,8	<0,2
Fluoranteno	0,2	11,8	49,4
Pireno	0,2	11,8	152,0
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	11,8	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	11,8	<0,4
Criseno	0,4	11,8	<0,4
C1-Criseno	0,4	11,8	<0,4
C2-Criseno	0,4	11,8	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	11,8	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	11,8	<0,1
Perileno	0,1	11,8	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	11,8	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	11,8	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	11,8	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			422,5
Σ HPA			422,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			52,5
Lipídios (%)			22,0

TCA = Amostra de Gordura

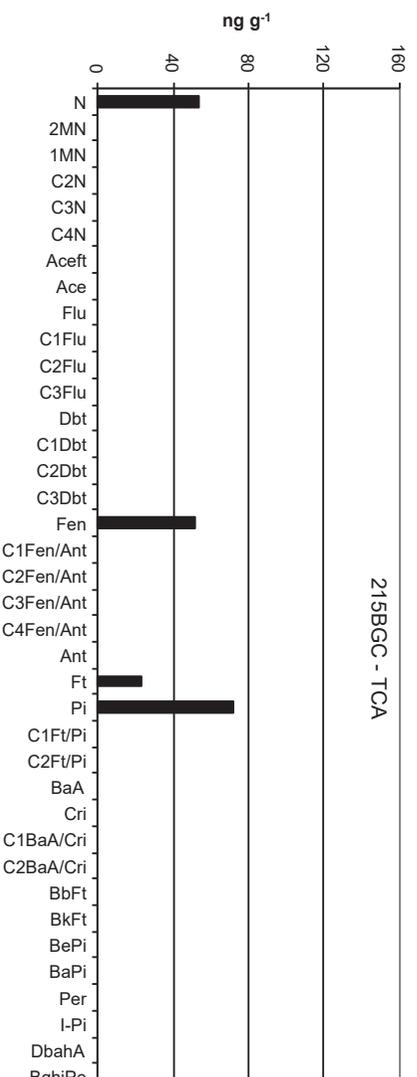
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

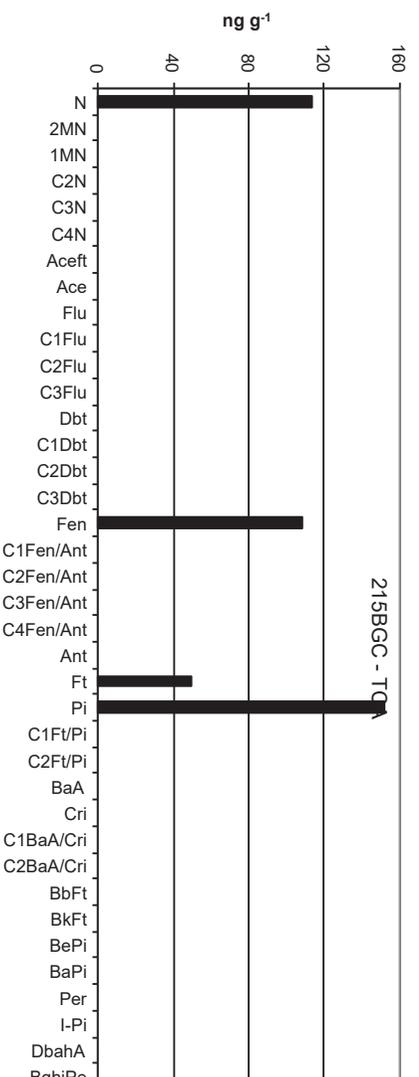
Amostra 215BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

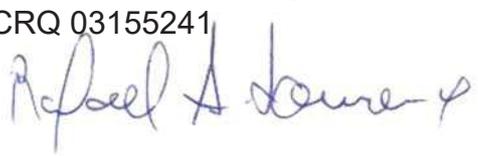


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	809/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	216BGC / 32626 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	08/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido			216BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	48,4
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	41,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	19,1
Pireno	0,1	5,6	58,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			167,7
Σ HPA			167,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			63
Umidade (%)			80,0
Lipídios (%)			20,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

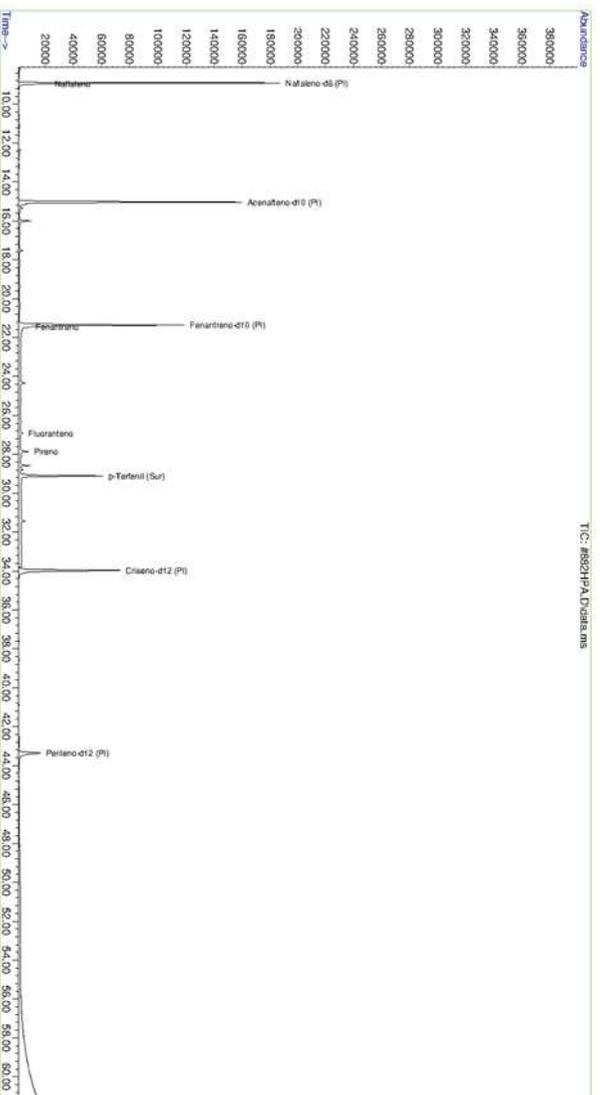
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			216BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	1,9	28,1	242,0
2-Metilnaftaleno	1,9	28,1	<1,9
1-Metilnaftaleno	1,9	28,1	<1,9
C2-Naftaleno	1,9	28,1	<1,9
C3-Naftaleno	1,9	28,1	<1,9
C4-Naftaleno	1,9	28,1	<1,9
Acenaftileno	0,4	28,1	<0,4
Acenafteno	0,4	28,1	<0,4
Fluoreno	0,2	28,1	<0,2
C1-Fluoreno	0,2	28,1	<0,2
C2-Fluoreno	0,2	28,1	<0,2
C3-Fluoreno	0,2	28,1	<0,2
Dibenzotiofeno	0,6	28,1	<0,6
C1-Dibenzotiofeno	0,6	28,1	<0,6
C2-Dibenzotiofeno	0,6	28,1	<0,6
C3-Dibenzotiofeno	0,6	28,1	<0,6
Fenantreno	0,9	28,1	209,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,9	28,1	<0,9
C2-Fenantreno-antraceno	0,9	28,1	<0,9
C3-Fenantreno-antraceno	0,9	28,1	<0,9
C4-Fenantreno-antraceno	0,9	28,1	<0,9
Antraceno	0,4	28,1	<0,4
Fluoranteno	0,6	28,1	95,4
Pireno	0,4	28,1	291,7
C1-Fluoranteno-pireno	0,6	28,1	<0,6
C2-Fluoranteno-pireno	0,6	28,1	<0,6
Benzo(a)antraceno	0,9	28,1	<0,9
Criseno	0,9	28,1	<0,9
C1-Criseno	0,9	28,1	<0,9
C2-Criseno	0,9	28,1	<0,9
Benzo(b)fluoranteno	0,6	28,1	<0,6
Benzo(k)fluoranteno	0,6	28,1	<0,6
Benzo(e)pireno	0,2	28,1	<0,2
Benzo(a)pireno	0,2	28,1	<0,2
Perileno	0,2	28,1	<0,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,4	28,1	<0,4
Dibenzo(a,h)antraceno	0,4	28,1	<0,4
Benzo(g,h,i)perileno	0,2	28,1	<0,2
Σ16 HPA Prioritários			838,2
Σ HPA			838,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			63
Umidade (%)			80,0
Lipídios (%)			20,0

TCA = Amostra de Gordura

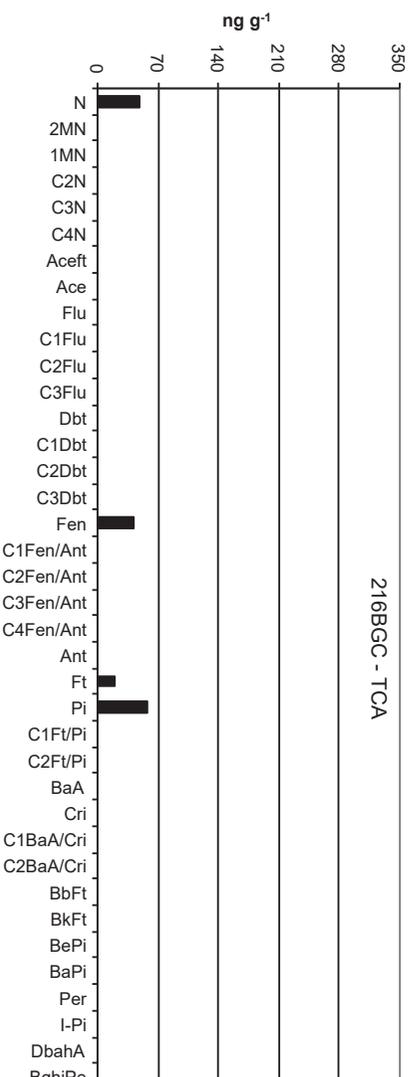
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

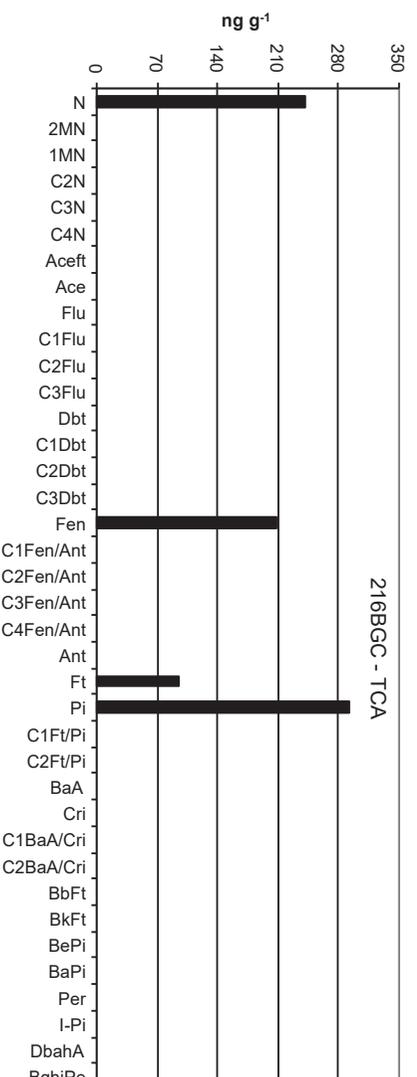
Amostra 216BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min⁻¹ foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno-d₈, Acenafteno-d₁₀, Fenantreno-d₁₀, Criseno-d₁₂ e Perileno-d₁₂, concentração final de 0,5 ng μ L⁻¹ de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min⁻¹ até 100°C, aquecida a 5°C min⁻¹ até 230°C, aquecida a 2°C min⁻¹ até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min⁻¹ até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹ (0,0025 ng μ L⁻¹, 0,005 ng μ L⁻¹, 0,025 ng μ L⁻¹, 0,050 ng μ L⁻¹, 0,25 ng μ L⁻¹ e 0,50 ng μ L⁻¹) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

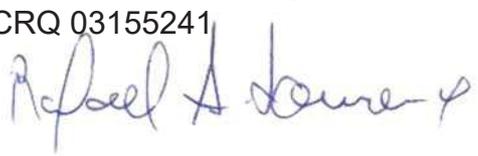


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	810/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SIsPMC)/Código do Avistamento	217BGC / 32626 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	08/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido			217BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	93,0
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	57,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	23,1
Pireno	0,1	5,6	72,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			245,3
Σ HPA			245,3
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			57,6
Lipídios (%)			17,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

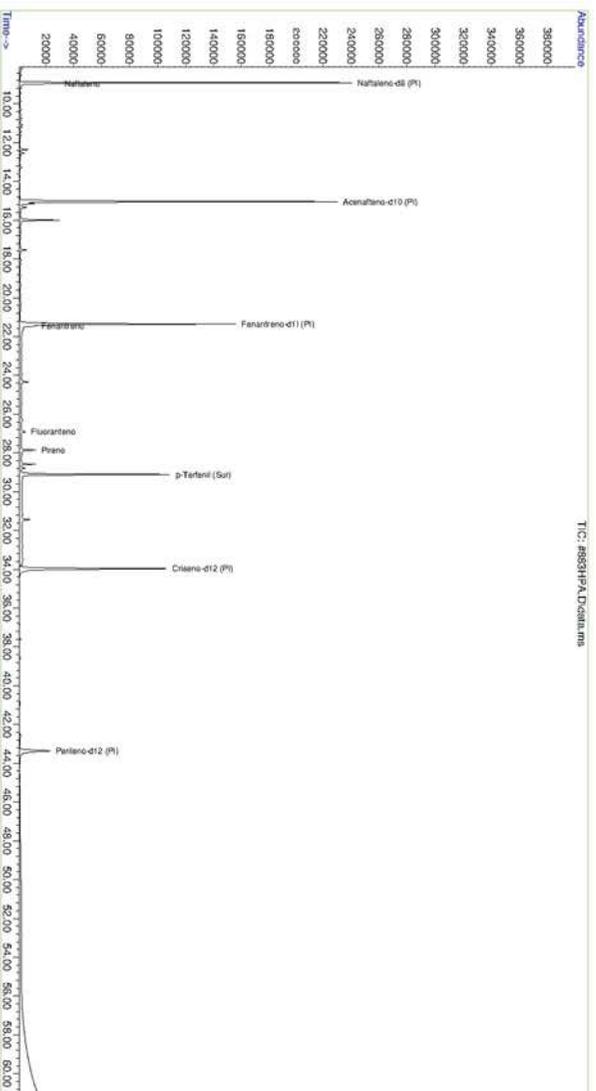
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			217BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,3	219,5
2-Metilnaftaleno	0,9	13,3	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,3	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,3	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,3	<0,2
Acenafteno	0,2	13,3	<0,2
Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,3	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,3	<0,3
Fenantreno	0,4	13,3	134,7
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,3	<0,4
Antraceno	0,2	13,3	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,3	54,4
Pireno	0,2	13,3	170,4
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,3	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,3	<0,4
Criseno	0,4	13,3	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,3	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,3	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,3	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,3	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,3	<0,1
Perileno	0,1	13,3	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,3	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,3	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,3	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			579,1
Σ HPA			579,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			78
Umidade (%)			57,6
Lipídios (%)			17,0

TCA = Amostra de Gordura

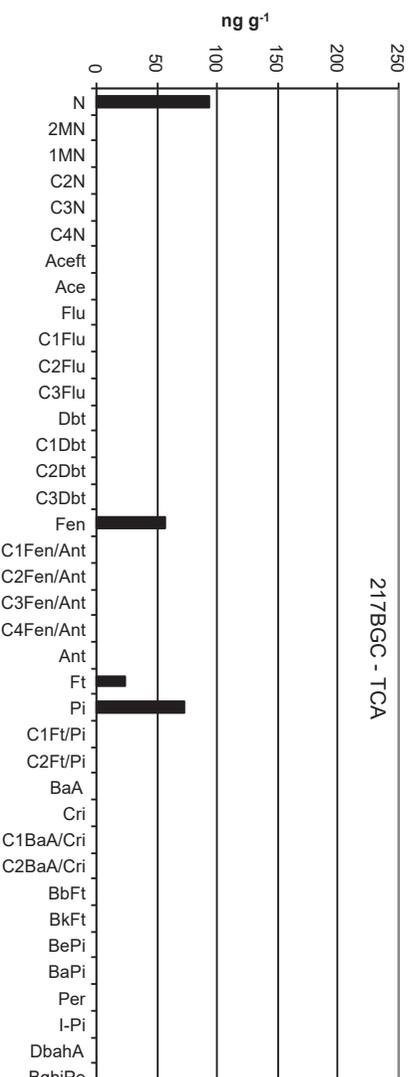
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

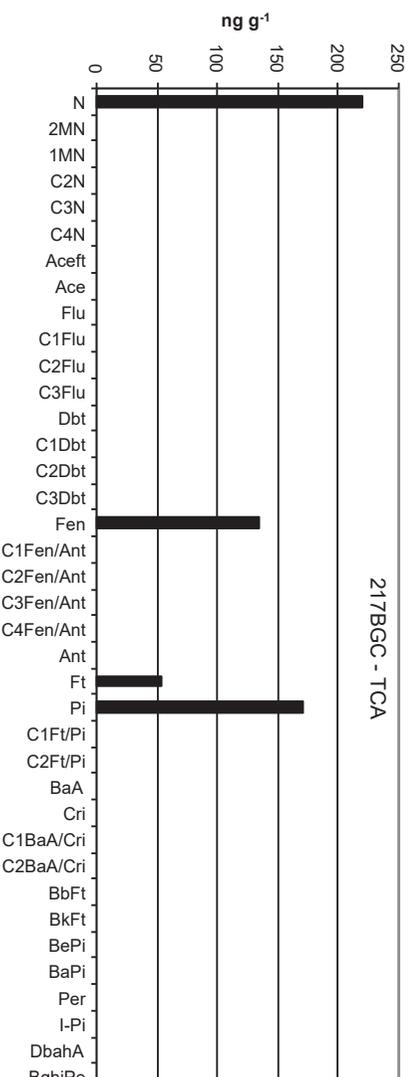
Amostra 217BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μ L, 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. . Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

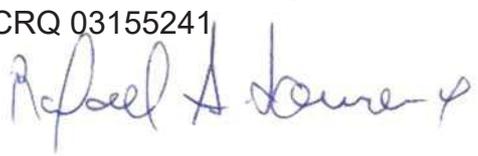


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	811/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	224BGC / 32712 – <i>S. longirostris</i>
Data de Coleta	19/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido			224BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	71,1
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	34,1
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			105,2
Σ HPA			105,2
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			77
Umidade (%)			58,3
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

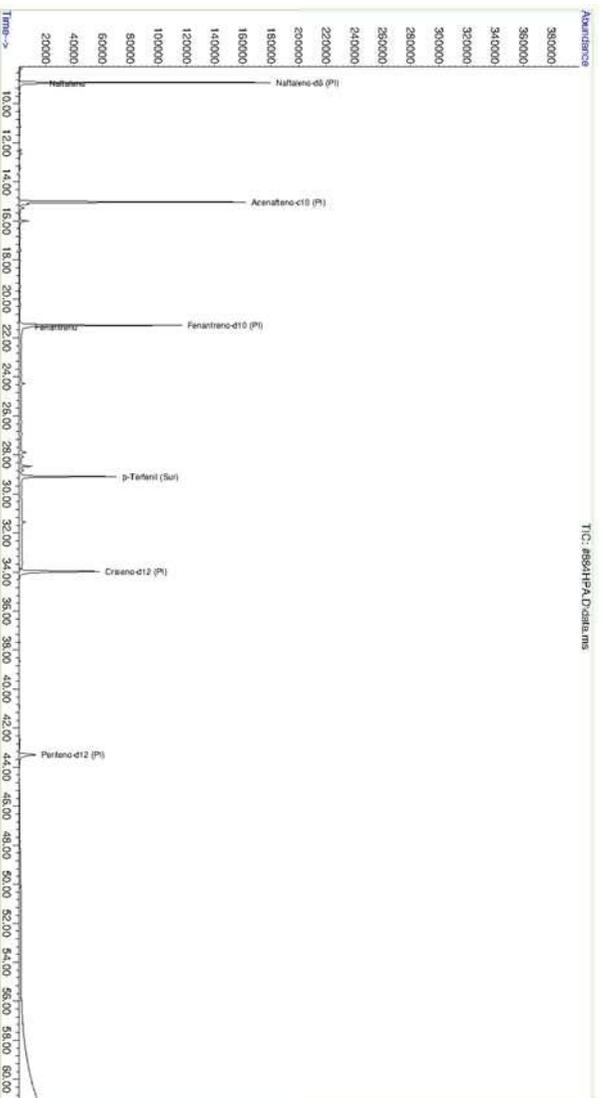
Biópsia (SiSPMC)/Tecido			224BGC
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,9	13,5	170,3
2-Metilnaftaleno	0,9	13,5	<0,9
1-Metilnaftaleno	0,9	13,5	<0,9
C2-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
C3-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
C4-Naftaleno	0,9	13,5	<0,9
Acenaftileno	0,2	13,5	<0,2
Acenafteno	0,2	13,5	<0,2
Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	13,5	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	13,5	<0,3
Fenantreno	0,4	13,5	81,8
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	13,5	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	13,5	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	13,5	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	13,5	<0,4
Antraceno	0,2	13,5	<0,2
Fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Pireno	0,2	13,5	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	13,5	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	13,5	<0,4
Criseno	0,4	13,5	<0,4
C1-Criseno	0,4	13,5	<0,4
C2-Criseno	0,4	13,5	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	13,5	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	13,5	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	13,5	<0,1
Perileno	0,1	13,5	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	13,5	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	13,5	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	13,5	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			252,0
Σ HPA			252,0
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			77
Umidade (%)			58,3
Lipídios (%)			10,0

TCA = Amostra de Gordura

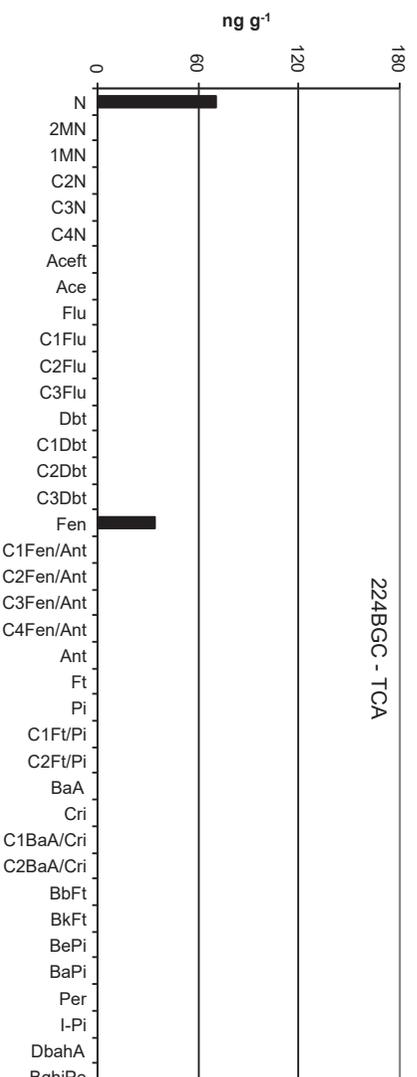
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

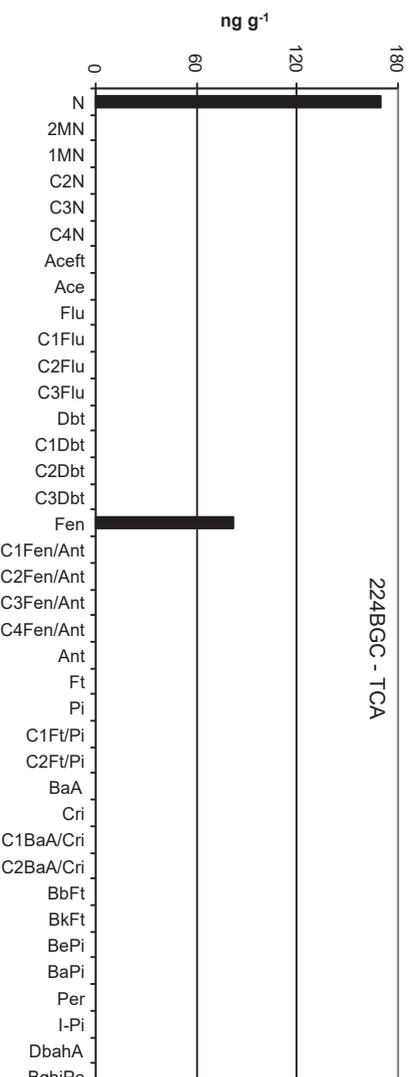
Amostra 224BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

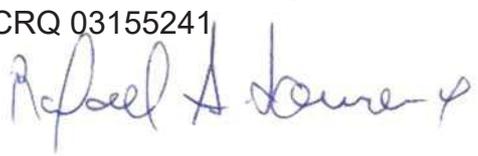


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	812/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/SPMC)/Código do Avistamento	228BGC / 32720 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	20/02/2018
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	03/05/2018
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	08/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	228BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	33,9
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			33,9
Σ HPA			33,9
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			55,2
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

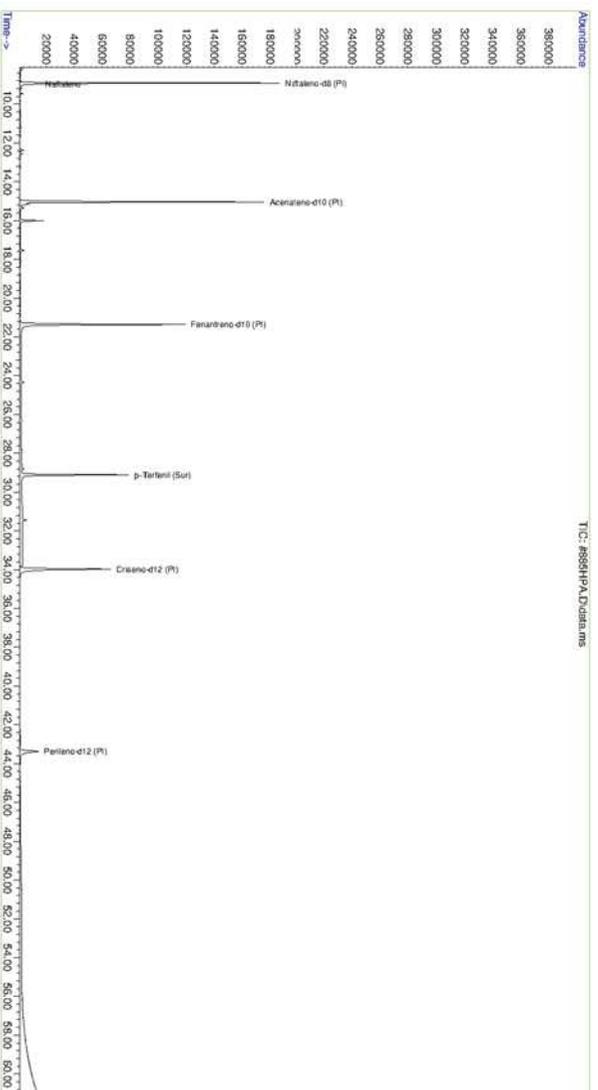
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	228BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,6	75,7
2-Metilnaftaleno	0,8	12,6	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,6	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,6	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,6	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,6	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,6	<0,2
Acenafteno	0,2	12,6	<0,2
Fluoreno	0,1	12,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,6	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,6	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,6	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,6	<0,3
Fenantreno	0,4	12,6	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,6	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,6	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,6	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,6	<0,4
Antraceno	0,2	12,6	<0,2
Fluoranteno	0,3	12,6	<0,3
Pireno	0,2	12,6	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,3	12,6	<0,3
C2-Fluoranteno-pireno	0,3	12,6	<0,3
Benzo(a)antraceno	0,4	12,6	<0,4
Criseno	0,4	12,6	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,6	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,6	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,3	12,6	<0,3
Benzo(k)fluoranteno	0,3	12,6	<0,3
Benzo(e)pireno	0,1	12,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,6	<0,1
Perileno	0,1	12,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,6	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,6	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			75,7
Σ HPA			75,7
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			80
Umidade (%)			55,2
Lipídios (%)			12,0

TCA = Amostra de Gordura

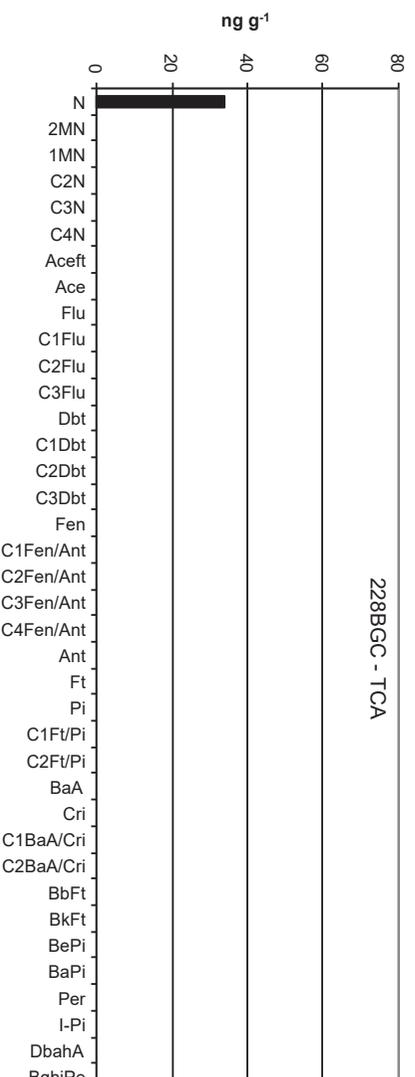
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

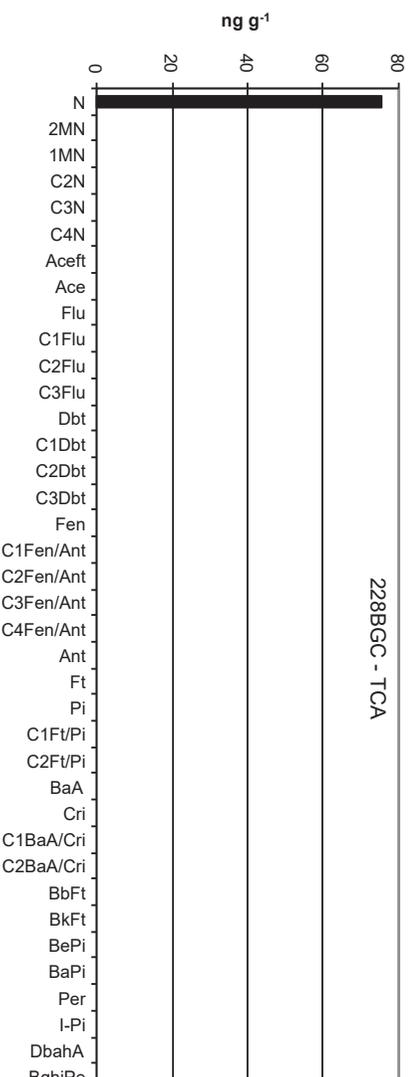
Amostra 228BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	081BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	49,0	50,0	98,0	46,6	50,0	93,2
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,8	50,0	91,6	54,7	50,0	109,4
Acenafteno	<0,1	<0,1	46,2	50,0	92,5	51,3	50,0	102,6
Fluoreno	<0,1	<0,1	43,7	50,0	87,5	52,5	50,0	105,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	43,3	50,0	86,6	45,7	50,0	91,4
Fenantreno	<0,3	<0,3	50,0	50,0	99,9	47,1	50,0	94,3
Antraceno	<0,1	<0,1	41,0	50,0	82,0	50,0	50,0	100,1
Fluoranteno	<0,2	<0,2	48,8	50,0	97,5	48,9	50,0	97,8
Pireno	<0,1	<0,1	44,9	50,0	89,8	49,0	50,0	98,0
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	44,1	50,0	88,2
Criseno	<0,3	<0,3	49,0	50,0	98,0	51,1	50,0	102,2
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,1	50,0	98,3	54,7	50,0	109,4
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	44,7	50,0	89,5	41,2	50,0	82,4
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	49,7	50,0	99,5	43,7	50,0	87,4
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,6	50,0	91,2	47,2	50,0	94,4
Perileno	<0,1	<0,1	46,4	50,0	92,8	51,5	50,0	103,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	47,4	50,0	94,9	43,7	50,0	87,4
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,7	47,9	50,0	95,8
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	44,1	50,0	88,3	39,6	50,0	79,2

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 041.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

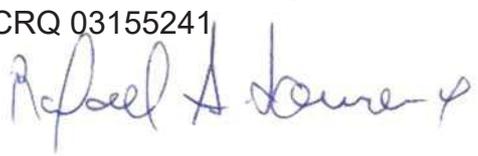


Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos



Laudo de Análises Químicas – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Projeto de Monitoramento de Cetáceos

Número do laudo	781/2018 rev 00
Solicitante / Endereço	PETROBRAS – Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos / Rua Marquês de Herval, 90 - 14º andar – CEP 11010-310 – Santos, SP. Telefone: (13)32494111 – Barbara Prates Carpeggiani
Laboratório executor / Endereço	Instituto Oceanográfico da USP / Praça do Oceanográfico, 191 – Sala 186 - CEP 05508-120 – São Paulo, SP. Telefone: (11)30916595 / (11)30916570 Prof. Dr. Rafael André Lourenço
Amostra	Gordura (TCA)
Identificador do Indivíduo (SI/PMC)/Código do Avistamento	001BGC / 24088 – <i>T. truncatus</i>
Data de Coleta	30/12/2015
Instituição Responsável pela Coleta	Socioambiental
Data de Recebimento	28/06/2017
Condição de recebimento	Adequada – N ₂ líquido
Condição de armazenamento	Ultra-Freezer (-80°C)
Método de Extração	USEPA 3540C – Detalhes no laudo
Métodos de Purificação	USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 - Detalhes no laudo
Método de Quantificação	USEPA 8270 - Detalhes no laudo
Período de Análise	07/08/2018 a 21/09/2018
Responsáveis pela análise	Josilene da Silva / Satie Taniguchi / Rafael Andre Lourenço
Responsável pela aprovação do Laudo	Rafael André Lourenço CRQ 03155241 
Data de Emissão do Laudo	25/09/2018

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso úmido** (ng g⁻¹)

Biópsia (SiSPMC)/Tecido	001BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,4	5,6	19,1
2-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
1-Metilnaftaleno	0,4	5,6	<0,4
C2-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C3-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
C4-Naftaleno	0,4	5,6	<0,4
Acenaftileno	0,1	5,6	<0,1
Acenafteno	0,1	5,6	<0,1
Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C1-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C2-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
C3-Dibenzotiofeno	0,1	5,6	<0,1
Fenantreno	0,2	5,6	<0,2
C1-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C2-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C3-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
C4-Fenantreno-antraceno	0,2	5,6	<0,2
Antraceno	0,1	5,6	<0,1
Fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Pireno	0,1	5,6	<0,1
C1-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
C2-Fluoranteno-pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)antraceno	0,2	5,6	<0,2
Criseno	0,2	5,6	<0,2
C1-Criseno	0,2	5,6	<0,2
C2-Criseno	0,2	5,6	<0,2
Benzo(b)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(e)pireno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	5,6	<0,1
Perileno	0,1	5,6	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1	5,6	<0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	0,1	5,6	<0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	5,6	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			19,1
Σ HPA			19,1
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			55,0
Lipídios (%)			21,0

TCA = Amostra de Gordura

LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Resultado em **peso seco** (ng g⁻¹)

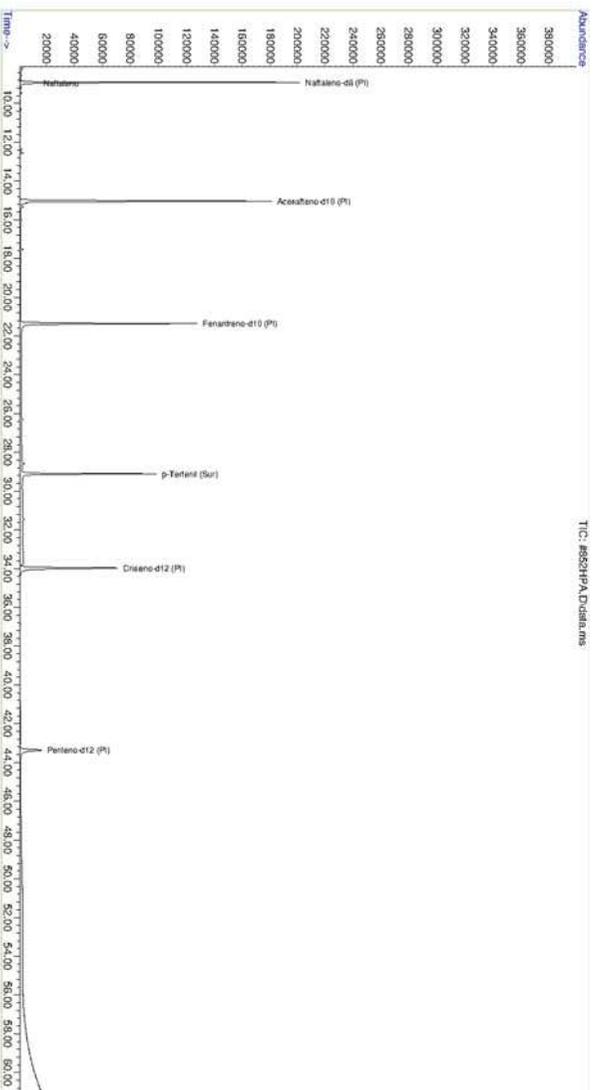
Biópsia (SiSPMC)/Tecido	001BGC		
	LD	LQ	TCA
Naftaleno	0,8	12,5	42,5
2-Metilnaftaleno	0,8	12,5	<0,8
1-Metilnaftaleno	0,8	12,5	<0,8
C2-Naftaleno	0,8	12,5	<0,8
C3-Naftaleno	0,8	12,5	<0,8
C4-Naftaleno	0,8	12,5	<0,8
Acenaftileno	0,2	12,5	<0,2
Acenafteno	0,2	12,5	<0,2
Fluoreno	0,1	12,5	<0,1
C1-Fluoreno	0,1	12,5	<0,1
C2-Fluoreno	0,1	12,5	<0,1
C3-Fluoreno	0,1	12,5	<0,1
Dibenzotiofeno	0,3	12,5	<0,3
C1-Dibenzotiofeno	0,3	12,5	<0,3
C2-Dibenzotiofeno	0,3	12,5	<0,3
C3-Dibenzotiofeno	0,3	12,5	<0,3
Fenantreno	0,4	12,5	<0,4
C1-Fenantreno-antraceno	0,4	12,5	<0,4
C2-Fenantreno-antraceno	0,4	12,5	<0,4
C3-Fenantreno-antraceno	0,4	12,5	<0,4
C4-Fenantreno-antraceno	0,4	12,5	<0,4
Antraceno	0,2	12,5	<0,2
Fluoranteno	0,2	12,5	<0,2
Pireno	0,2	12,5	<0,2
C1-Fluoranteno-pireno	0,2	12,5	<0,2
C2-Fluoranteno-pireno	0,2	12,5	<0,2
Benzo(a)antraceno	0,4	12,5	<0,4
Criseno	0,4	12,5	<0,4
C1-Criseno	0,4	12,5	<0,4
C2-Criseno	0,4	12,5	<0,4
Benzo(b)fluoranteno	0,2	12,5	<0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,2	12,5	<0,2
Benzo(e)pireno	0,1	12,5	<0,1
Benzo(a)pireno	0,1	12,5	<0,1
Perileno	0,1	12,5	<0,1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,2	12,5	<0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,2	12,5	<0,2
Benzo(g,h,i)perileno	0,1	12,5	<0,1
Σ16 HPA Prioritários			42,5
Σ HPA			42,5
Recuperação - p-Terfenil d14 (%)			65
Umidade (%)			55,0
Lipídios (%)			21,0

TCA = Amostra de Gordura

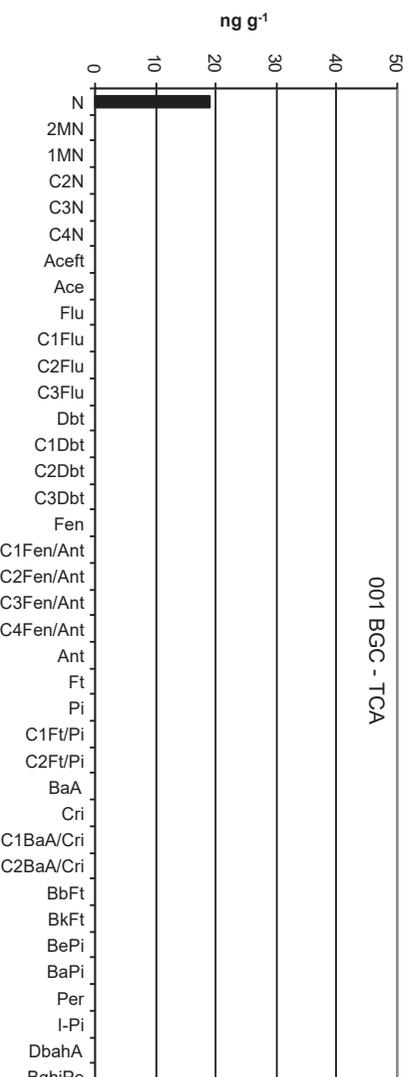
LD = Limite de Detecção do Método

LQ = Limite de Quantificação do Método

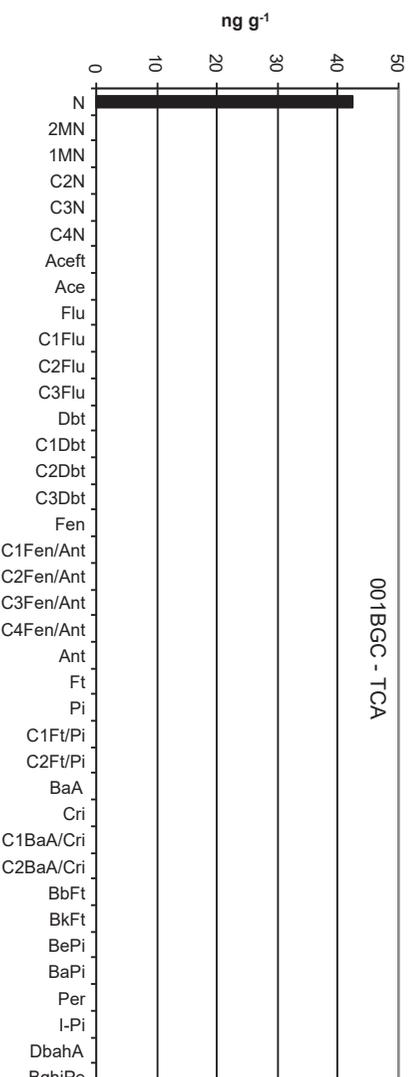
Amostra 001BGC – TCA – Cromatograma Total de Íons



Histograma (peso úmido – ng g⁻¹)



Histograma (peso seco – ng g⁻¹)



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

1. Procedimentos

1.1 Coleta

As amostras coletadas a partir de biópsia foram coletadas por equipes designadas pela Petrobras sem a participação do LabQOM. As amostras foram entregues no LabQOM congeladas (-80°C) juntamente com as cadeias de custódia. A partir de então foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o início das análises.

1.2 Análise

Determinação de HPAs

Para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram considerados nesse trabalho os 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA) (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), os compostos dibenzotiofeno, perileno e benzo(e)pireno, além dos seguintes HPAs alquilados: C1- a C4- naftalenos, C1- a C3- fluorenos, C1- a C3- dibenzotiofenos, C1- a C4- fenantrenos-antracenos, C1- e C2- fluorantenos-pirenos, e C1- e C2- crisenos.

Os procedimentos analíticos descritos a seguir seguem as recomendações das normas da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA 3540C (extração), USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640 (purificação) e USEPA 8270 (quantificação) com algumas adaptações baseadas no documento da Administração Americana para o Oceano e Atmosfera (NOAA) descrito em Wade e Cantillo (1994) e em literatura recente (Lavandier et al., 2016, Baldassim et al., 2016, Montone et al., 2016, Méndez-Fernandez et al., 2016, Taniguchi et al., 2016, Colabuono et al., 2016, Colabuono et al., 2015, Magalhães et al., 2017).

Materiais

Todo material utilizado, vidraria, pinças, lâminas, etc. foi imerso em solução com detergente alcalino, Extran®, durante 24 horas, enxaguado, rinsado com água deionizada, seco em estufa ou em temperatura ambiente no caso de materiais volumétricos. Após seco, todo o material foi descontaminado com diclorometano e n-hexano antes da utilização. De forma alternativa, quando as características do material permitiram, o material foi calcinado a 400°C durante 4 horas.

Agentes secantes e adsorventes como sulfato de sódio (J. T. Baker, EUA), sílica e alumina (Merck, Alemanha) foram calcinados a 400°C antes de serem utilizados.

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Os solventes utilizados, n-hexano e diclorometano (J. T. Baker, EUA) foram de pureza grau-pesticida.

A água utilizada para desativar a sílica e a alumina foi deionizada e posteriormente extraída três vezes com n-hexano.

Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada por gravimetria. Para tanto, uma fração de cada uma das amostras de tecido foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica e mantido em estufa aberta (30°C) até verificação de peso constante. A fração de amostra utilizada variou em função da massa disponível de tecido. Com a diferença entre a massa úmida e a massa seca foi calculado o teor de umidade em porcentagem.

Extração

A extração dos tecidos dos organismos foi baseada no método EPA 3540C. Utilizou-se 0,10 g de amostra de tecido úmido previamente triturado e homogeneizado que foi macerado com 10 g de sulfato de sódio anidro. Foi adicionado o padrão subrogado p-terfenil-d₁₄ (125 ng) para os HPAs. Procedeu-se a extração em Soxhlet por 8 horas com n-hexano e diclorometano (1:1 v,v). Os extratos foram concentrados para 1 mL em evaporador rotativo com pressão reduzida, de onde se retirou 0,1 mL para determinação do teor lipídico por gravimetria.

Determinação do teor lipídico

Para a determinação do teor lipídico foi separado 0,1 mL dos extratos orgânicos concentrados, conforme citado. Este volume foi transferido para um frasco de vidro previamente pesado em balança analítica. Após a evaporação total do solvente em temperatura ambiente cada frasco foi novamente pesado e a diferença de massa (resíduo) foi utilizada no cálculo do teor de lipídios em porcentagem (USEPA 8290 adaptado, Magalhães et al., 2017).

Purificação

Para a etapa de purificação dos extratos orgânicos contendo os HPAs foi seguida a metodologia adaptada dos protocolos USEPA 3610, USEPA 3630 e USEPA 3640. Os 0,9 mL restantes de cada um dos extratos foram eluídos com 80 mL de mistura n-hexano e diclorometano (1:1, v:v) através de coluna de vidro (25 cm de altura x 1,5

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

cm de diâmetro interno) contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina e 1 grama de sulfato de sódio no topo. A sílica e a alumina foram previamente desativadas 5% com água (água deionizada e extraída com n-hexano). O eluato foi então concentrado para 1,0 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent (1260 Infinity II) acoplado a um detector de comprimento de onda variável (Agilent 1260 VWD) equipado com uma pré-coluna (Phenogel Guard 10 μL , 50 x 7,8 mm, Phenomenex, EUA) conectada em série com duas colunas de exclusão por tamanho (Phenogel 10 μ , 100 A, 22,5 x 250 mm, Phenomenex, EUA). Diclorometano com um fluxo de 5 mL min^{-1} foi utilizado para a eluição dos compostos. Para o monitoramento da eluição dos HPA nas colunas foi utilizado o detector ajustado em 254 nm. A fração de 0 a 30 min foi descartada e coletada a fração contendo os HPAs entre 30 e 40 min.

Os extratos contendo os HPAs foram concentrados para 0,2 mL onde foram adicionados os padrões internos para os HPAs (Naftaleno- d_8 , Acenafteno- d_{10} , Fenantreno- d_{10} , Criseno- d_{12} e Perileno- d_{12} , concentração final de 0,5 ng μL^{-1} de cada), totalizando o volume de 0,25 mL.

Quantificação

A análise e a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM Agilent Technologies 6890/5973N) operando em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), seguindo o disposto no protocolo USEPA 8270.

Para os HPAs a temperatura no injetor e na interface foi programada em 280°C e a temperatura na fonte de íons foi programada em 300°C. O injetor foi equipado com septo Merlin Microseal® (Merlin Instrument Company, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica HP-5MS (Agilent J&W GC Columns) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura teve início em 40°C por 2 min, então aquecida a 25°C min^{-1} até 100°C, aquecida a 5°C min^{-1} até 230°C, aquecida a 2°C min^{-1} até 270°C onde permaneceu por 5 minutos e por fim aquecida a 5°C min^{-1} até 300°C.

Para os HPAs o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração no limite inferior, abrangendo a faixa de concentração entre 0,0025 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1} (0,0025 ng μL^{-1} , 0,005 ng μL^{-1} , 0,025 ng μL^{-1} , 0,050 ng μL^{-1} , 0,25 ng μL^{-1} e 0,50 ng μL^{-1}) contendo os 16 HPAs prioritários controlados pelo método além do dibenzotiofeno, benzo(e)pireno e perileno. A equação de reta da curva de calibração

Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

de cada um dos compostos apresentou coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. A quantificação foi baseada na padronização interna, utilizando-se como PI (padrão interno) uma mistura contendo naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , em concentração igual a 500 ng mL^{-1} . OS HPAs alquilados foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado. Os limites de detecção do método (LD) foram definidos como 3 vezes o desvio padrão (DP) da quantificação de 7 replicatas de uma amostra ($LD = 3 \times DP$) (Wade & Cantillo, 1994). O Limite de Quantificação do Método (LQ) foi definido pelo primeiro ponto da curva de calibração. LD e LQ para cada composto foram calculados em relação à massa extraída.

1.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade das análises foram analisados brancos (sulfato de sódio), brancos fortificados e amostras fortificadas (amostras acrescidas dos compostos de interesse, HPAs 50 ng g^{-1}). Os resultados e as recuperações dos compostos, descritos a seguir, estão dentro das faixas de aceitação do método – Análise de branco, branco fortificado e de amostra fortificada foi realizada juntamente com a análise da amostra referida neste laudo.

Resultado do controle analítico das análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, resultados em ng g^{-1} .

	Branco Analítico	Concentração Esperada	Branco Fortificado	Concentração Esperada	Recuperação (%)	055BGC (TCA) Fortificada	Concentração Esperada	Recuperação (%)
Naftaleno	<0,6	<0,6	52,9	50,0	105,8	50,7	50,0	101,5
Acenaftileno	<0,1	<0,1	45,0	50,0	90,1	43,3	50,0	86,7
Acenafteno	<0,1	<0,1	41,3	50,0	82,5	40,1	50,0	80,2
Fluoreno	<0,1	<0,1	46,1	50,0	92,1	43,0	50,0	86,0
Dibenzotiofeno	<0,2	<0,2	40,6	50,0	81,2	47,6	50,0	95,2
Fenantreno	<0,3	<0,3	52,2	50,0	104,5	48,0	50,0	96,1
Antraceno	<0,1	<0,1	44,2	50,0	88,4	41,3	50,0	82,6
Fluoranteno	<0,2	<0,2	52,8	50,0	105,7	46,0	50,0	91,9
Pireno	<0,1	<0,1	51,2	50,0	102,4	51,2	50,0	102,4
Benzo(a)antraceno	<0,3	<0,3	42,6	50,0	85,1	52,0	50,0	104,0
Criseno	<0,3	<0,3	52,9	50,0	105,8	51,5	50,0	103,0
Benzo(b)fluoranteno	<0,2	<0,2	49,5	50,0	99,0	50,0	50,0	100,1
Benzo(k)fluoranteno	<0,2	<0,2	42,7	50,0	85,5	40,2	50,0	80,5
Benzo(e)pireno	<0,1	<0,1	54,7	50,0	109,5	37,8	50,0	75,7
Benzo(a)pireno	<0,1	<0,1	45,7	50,0	91,3	45,7	50,0	91,4
Perileno	<0,1	<0,1	48,9	50,0	97,8	36,1	50,0	72,2
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<0,1	<0,1	52,1	50,0	104,2	40,3	50,0	80,5
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,1	<0,1	51,4	50,0	102,9	44,5	50,0	88,9
Benzo(g,h,i)perileno	<0,1	<0,1	40,9	50,0	81,9	36,2	50,0	72,5

Recuperação Esperada: Entre 45 e 120 %

Foi realizada também a análise de material de referência (MR) de mexilhão (NIST, SRM 2974a, Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue - *Mytilus edulis*) para contemplar todos os compostos de interesse. Os resultados do material de referência estão dentro da faixa esperada – MR analisado em 09/05/2018.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Maiores detalhes do controle de qualidade dessa amostra são apresentados no Laudo: Controle 040.

2. Referências

Baldassin, P., Taniguchi, S., Gallo, H., Maranhão, A., Kolesnikovas, C., Amorim, D.B., Mansilla, M., Navarro, R.M., Tabeira, L.C., Bicego, M.C., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. *Chemosphere (Oxford)*, v. 149, p. 391-399, 2016.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Petry, M.V., Montone, R.C. Organochlorine contaminants and polybrominated diphenyl ethers in eggs and embryos of Antarctic birds. *Antarctic Science*, v. 1, p. 355-361, 2015.

Colabuono, F.I., Vander Pol, S.S., Huncik, K.M., Taniguchi, S., Petry, M.V., Kucklick, J.R., Montone, R.C. Persistent organic pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Pollution*, v. 216, p. 38-45, 2016.

Lavandier, R., Arêas, J., Quinete, N., Moura, J.F., Taniguchi, S., Montone, R.C., Siciliano, S., Moreira, I. PCB and PBDE levels in a highly threatened dolphin species from the Southeastern Brazilian coast. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 442-449, 2016.

Magalhães, C.A., Taniguchi, S., Lourenço, R.A., Montone, R.C. Organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in liver and muscle tissues of *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* and *Cathorops spixii* in Santos Bay and surrounding area, São Paulo, Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 16, p. 42-48, 2017.

Méndez-Fernandez, P, Galluzzi, P.P., Taniguchi, S., Santos, M.C.O, Montone, R.C. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 107, p. 364-369, 2016.

Montone, R.C., Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Martins, C.C., Cipro, C.V.Z., Barroso, H., Silva, J., Bicego, M.C., Weber, R.R. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay - An Antarctic specially managed area. *Marine Pollution Bulletin.*, p. 377-382, 2016.



Laboratório de Química Orgânica Marinha (LabQOM)

Laudo de Análises – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Tecidos de Tetrápodes Marinhos

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R. Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J. Yamashira, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bicego, M.C., Montone, M.C. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 106, p. 87-94, 2016.

Wade T.L., Cantillo, A.Y. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. *Chemistry Workbook 1994. National Status and Trend Program for Marine Environmental Quality*, NOAA, Silver Spring, 1994.

Laboratório de Química Orgânica Marinha
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Prof. Dr. Rafael André Lourenço
CRQ 03155241

Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS

3º Relatório Anual – Ciclos 1 a 6

Volume II: Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos



Revisão 00

E&P

Fevereiro/2019



PETROBRAS

**Projeto de Monitoramento
de Cetáceos na Bacia de Santos
PMC-BS**

3º Relatório Anual – Ciclos 1 a 6

**Volume II: Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento
sobre os Cetáceos da Bacia de Santos**

**Revisão 00
Fevereiro / 2019**



E&P

ÍNDICE GERAL

VOLUME I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos

VOLUME II: Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos

LISTA DE QUADROS	5
LISTA DE FIGURAS	6
APRESENTAÇÃO.....	10
EQUIPE TÉCNICA EXECUTORA DO PMC-BS	11
EQUIPE DE ELABORAÇÃO DO GUIA DE ESPÉCIES	12
INTRODUÇÃO	13
I. Mysticeti.....	15
I.1 Família Balaenidae.....	15
I.1.1 Baleia-franca (<i>Eubalaena australis</i>).....	16
I.2 Família Balaenopteridae.....	19
I.2.1 Baleia-azul (<i>Balaenoptera musculus</i>)	22
I.2.2 Baleia-fin (<i>Balaenoptera physalus</i>).....	26
I.2.3 Baleia-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>).....	30
I.2.4 Baleia-de-Bryde (<i>Balaenoptera brydei</i>).....	35
I.2.5 Baleia-minke-anã (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>).....	39
I.2.6 Baleia-minke-antártica (<i>Balaenoptera bonaerensis</i>)	43
I.2.7 Baleia-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i>).....	47
II. Odontoceti	52
II.1 Família Physeteridae.....	52
II.1.1 Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>).....	53
II.2 Família Kogiidae.....	58
II.2.1 Cachalote-pigmeu (<i>Kogia breviceps</i>).....	60
II.2.2 Cachalote-anão (<i>Kogia sima</i>).....	63
II.3 Família Ziphiidae	66
II.4 Família Delphinidae.....	67
II.4.1 Orca (<i>Orcinus orca</i>)	68

II.4.2	Baleia-piloto-de-peitorais-curtas (<i>Globicephala macrorhyncus</i>).....	72
II.4.3	Baleia-piloto-de-peitorais-longas (<i>Globicephala melas</i>).....	76
II.4.4	Falsa-orca (<i>Pseudorca crassidens</i>)	79
II.4.5	Orca-pigméia (<i>Feresa attenuata</i>).....	83
II.4.6	Golfinho-cabeça-de-melão (<i>Peponocephala electra</i>).....	87
II.4.7	Golfinho-de-Risso (<i>Grampus griseus</i>).....	91
II.4.8	Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	95
II.4.9	Golfinho-de-dentes-rugosos (<i>Steno bredanensis</i>)	99
II.4.10	Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus</i>)	103
II.4.11	Golfinho-pintado-pantropical (<i>Stenella attenuata</i>).....	107
II.4.12	Golfinho-pintado-do-Atlântico (<i>Stenella frontalis</i>).....	111
II.4.13	Golfinho-rotador (<i>Stenella longirostris</i>)	116
II.4.14	Golfinho-de-Clymene (<i>Stenella clymene</i>)	120
II.4.15	Golfinho-comum (<i>Delphinus delphis</i>).....	124
II.4.16	Golfinho-de-Fraser (<i>Lagenodelphis hosei</i>).....	128
II.5	Família Pontoporidae	132
II.5.1	Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>).....	133
III.	Referências Bibliográficas	137

LISTA DE QUADROS

Quadro I.1.1-1: Descrição da baleia-franca, <i>Eubalaena australis</i>	16
Quadro I.2.2-1: Descrição da baleia-fin, <i>Balaenoptera physalus</i>	26
Quadro I.2.4-1: Descrição da baleia-de-Bryde, <i>Balaenoptera brydei</i>	35
Quadro I.2.5-1: Descrição da baleia-minke-anã, <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	39
Quadro I.2.7-1: Descrição da baleia-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i>	47
Quadro II.1.1-1: Descrição da cachalote, <i>Physeter macrocephalus</i>	53
Quadro II.2.2-1: Descrição da cachalote-anão, <i>Kogia sima</i>	63
Quadro II.4.2-1: Descrição da baleia-piloto-de-peitorais-curtas, <i>Globicephala macrorhynchus</i>	72
Quadro II.4.3-1: Descrição da baleia-piloto-de-peitorais-longas, <i>Globicephala melas</i>	76
Quadro II.4.4-1: Descrição da falsa-orca, <i>Pseudorca crassidens</i>	79
Quadro II.4.5-1: Descrição da orca-pigméia, <i>Feresa attenuata</i>	83
Quadro II.4.7-1: Descrição do golfinho-de-Risso, <i>Grampus griseus</i>	91
Quadro II.4.9-1: Descrição do golfinho-de-dentes-rugosos, <i>Steno bredanensis</i> . ..	99
Quadro II.4.10-1: Descrição do golfinho-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i> . ..	103
Quadro II.4.11-1: Descrição do golfinho-pintado-pantropical, <i>Stenella attenuata</i> . ..	107
Quadro II.4.12-1: Descrição do golfinho-pintado-do-Atlântico, <i>Stenella frontalis</i> . ..	111
Quadro II.4.13-1: Descrição da espécie <i>Stenella longirostris</i>	116
Quadro II.4.14-1: Descrição do golfinho-de-Clymene, <i>Stenella clymene</i>	120
Quadro II.4.15-1: Descrição do golfinho-comum, <i>Delphinus delphis</i>	124
Quadro II.5.1-1: Descrição da toninha, <i>Pontoporia blainvillei</i>	133

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Profundidades utilizadas pelas espécies ou gêneros de cetáceos observados na Bacia de Santos durante o PMC. Linha tracejada azul mostra o limite da plataforma e talude continental (isóbata dos 200 m) e o limite do talude continental com as regiões oceânicas (2.000 m).....	14
Figura I.1.1-1: Baleia-franca-austral (<i>Eubalaena australis</i>) observada na Bacia de Santos.	18
Figura I.2-1: Salto parcial de uma baleia-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) observada na Bacia de Santos.....	21
Figura I.2.1-1: Baleia-azul (<i>Balaenoptera musculus</i>) observada na Bacia de Santos.	24
Figura I.2.1-2: Localização dos registros de <i>Balaenoptera musculus</i> nas campanhas do PMC-BS.	25
Figura I.2.2-1: Baleias-fin (<i>Balaenoptera physalus</i>) observadas na Bacia de Santos.	28
Figura I.2.2-2: Localização dos registros de <i>Balaenoptera physalus</i> nas campanhas do PMC-BS.	29
Figura I.2.3-1: Baleia-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) observada na Bacia de Santos.	32
Figura I.2.3-2: Baleias-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) observadas na Bacia de Santos.	33
Figura I.2.3-3: Localização dos registros da baleia-sei (<i>Balaenoptera borealis</i>) durante o PMC-BS.....	34
Figura I.2.4-1: Baleias-de-Bryde (<i>Balaenoptera brydei</i>) observadas na Bacia de Santos.	37
Figura I.2.4-2: Localização dos registros de <i>Balaenoptera brydei</i> durante o PMC-BS.....	38
Figura I.2.5-1: Baleia-minke-anã (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>).....	41
Figura I.2.5-2: Localização dos registros de <i>Balaenoptera acutorostrata</i> durante o PMC-BS.....	42

Figura I.2.6-1: Baleia-minke-antártica (<i>Balaenoptera bonaerensis</i>) observada durante o PMC-BS.....	45
Figura I.2.6-2: Localização dos registros de <i>Balaenoptera bonaerensis</i> durante o PMC-BS.....	46
Figura I.2.7-1: Baleias-jubarte (<i>Megaptera novaeangliae</i>) observadas na Bacia de Santos.	50
Figura I.2.7-2: Localização dos registros de <i>Megaptera novaeangliae</i> durante o PMC-BS.....	51
Figura II.1.1-1: Cachalotes (<i>Physeter macrocephalus</i>) registrados durante o PMC-BS.....	56
Figura II.1.1-2: Localização dos registros de <i>Physeter macrocephalus</i> durante o PMC-BS.....	57
Figura II.2-1: Localização dos registros de <i>Kogia sp.</i> durante o PMC-BS.....	59
Figura II.3-1: Localização dos registros acústicos da Família Ziphiidae durante o PMC-BS.....	66
Figura II.4.1-1: Orcas (<i>Orcinus orca</i>) observadas na Bacia de Santos.	70
Figura II.4.1-2: Localização dos registros de <i>Orcinus orca</i> durante o PMC-BS. .	71
Figura II.4.2-1: Baleia-piloto-de-peitorais-curtas (<i>Globicephala macrorhynchus</i>) observada durante o PMC-BS.....	74
Figura II.4.2-2: Localização dos registros de <i>Globicephala sp.</i> durante o PMC-BS.....	75
Figura II.4.4-1: Falsa-orca (<i>Pseudorca crassidens</i>) registrada durante o PMC-BS.	81
Figura II.4.4-2: Localização dos registros de <i>Pseudorca crassidens</i> durante o PMC-BS.....	82
Figura II.4.5-1: Orca-pigméia (<i>Feresa attenuata</i>) observada durante o PMC-BS.	85
Figura II.4.5-1: Localização dos registros de <i>Feresa attenuata</i> durante o PMC-BS.....	86
Figura II.4.6-1: Golfinho-cabeça-de-melão (<i>Peponocephala electra</i>) observado durante o PMC-BS.....	89

Figura II.4.6-2: Localização dos registros de <i>Peponocephala electra</i> durante o PMC-BS.....	90
Figura II.4.7-1: Golfinhos-de-Risso (<i>Grampus griseus</i>) observados na Bacia de Santos.	93
Figura II.4.7-2: Localização dos registros de <i>Grampus griseus</i> durante o PMC-BS.....	94
Figura II.4.8-1: Botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) observados na Bacia de Santos.	97
Figura II.4.8-2: Localização dos registros de <i>Sotalia guianensis</i> durante o PMC-BS.....	98
Figura II.4.9-1: Golfinhos-dentes-rugosos (<i>Steno bredanensis</i>) observados na Bacia de Santos.....	101
Figura II.4.9-2: Localização dos registros de <i>Steno bredanensis</i> durante o PMC-BS.....	102
Figura II.4.10-1: Golfinhos-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>) observados na Bacia de Santos.....	105
Figura II.4.10-2: Localização dos registros de <i>Tursiops truncatus</i> durante o PMC-BS.....	106
Figura II.4.11-1: Golfinhos-pintados-pantropicais (<i>Stenella attenuata</i>) observados na Bacia de Santos.....	109
Figura II.4.11-2: Localização dos registros de <i>Stenella attenuata</i> durante o PMC-BS.....	110
Figura II.4.12-1:..... Golfinhos-pintados-do-Atlântico (<i>Stenella frontalis</i>) observados na Bacia de Santos.....	114
Figura II.4.12-2: Localização dos registros de <i>Stenella frontalis</i> durante o PMC-BS.....	115
Figura II.4.13-1: Grupos do golfinho-rotador (<i>Stenella longirostris</i>) observados na Bacia de Santos.....	118
Figura II.4.13-2: Localização dos registros de <i>Stenella longirostris</i> durante o PMC-BS.....	119

Figura II.4.14-1: Golfinho-de-Clymene (<i>Stenella clymene</i>) observado durante o PMC-BS.....	122
Figura II.4.14-2: Localização dos registros de <i>Stenella clymene</i> durante o PMC-BS.....	123
Figura II.4.15-1: Grupos do golfinho-comum (<i>Delphinus delphis</i>) observados na Bacia de Santos.....	126
Figura II.4.15-2: Localização dos registros do gênero <i>Delphinus</i> durante o PMC-BS.....	127
Figura II.5.1-1: Toninhas (<i>Pontoporia blainvillei</i>) observadas na Baía de Babitonga, durante o PMC-BS.....	135
Figura II.5.1-2: Localização dos registros de <i>Pontoporia blainvillei</i> durante o PMC-BS.....	136

APRESENTAÇÃO

O Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS objetiva atender demanda do Processo de Licenciamento Ambiental - IBAMA Nº 02001.114289/2017-80 - conduzido pela Coordenação Geral de Licenciamento Ambiental de Empreendimentos Marinhos e Costeiros – CGMac, da Diretoria de Licenciamento Ambiental – DILIC, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

O presente volume II do 3º Relatório Anual do PMC-BS apresenta o Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos, desenvolvido ao longo dos três primeiros anos de execução do PMC-BS, constituindo sua terceira versão, atualizada com base em sua segunda versão e nos dados gerados no último ano da execução do projeto, pela equipe da Socioambiental Consultores Associados para este projeto, sob a supervisão da equipe da Petrobras - SMS Meio Ambiente da Unidade de Operações de E&P da Bacia de Santos, mediante contrato nº 2400.0097391.15.2 entre esta empresa e a Petrobras.

Os cetáceos da Bacia de Santos foram estudados, portanto, por diferentes metodologias e plataformas de pesquisa do PMC na Bacia de Santos nos últimos três anos. Desta forma, este guia apresenta uma revisão sobre cada uma das espécies observadas no âmbito do PMC-BS, consolidando o conhecimento para cada espécie observada durante os três primeiros anos do projeto. São fornecidas informações sobre as características diagnósticas usadas na identificação de cada espécie, biologia geral, conhecimento disponível para a costa brasileira, além de um resumo dos registros realizados pelo PMC-BS. Também são fornecidos mapas de distribuição e fotografias do acervo do projeto.

O 3º Relatório Anual do PMC-BS, como um todo, é apresentado então em dois volumes: Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos; Volume II: Guia de Identificação e Síntese do Conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos.

EQUIPE TÉCNICA EXECUTORA DO PMC-BS

Nomes	Formação	Atuação
Coordenação e Gerência		
Ricardo Müller Arcari	Engº. Sanitarista e Ambiental	Gerente do Contrato
José Olimpio da Silva Jr.	Biólogo, Me. em Geografia	Coordenação Geral e Integração Temática
Leonardo Liberali Wedekin	Biólogo, Dr.	Coord. Técnica e Coord. Avistagem Embarcada
Aline Fernandes de Faria Gonçalves	Bióloga, Esp. Gestão Ambiental	Gerência Executiva
Ana Lúcia Cypriano de Souza	Bióloga, Dra.	Coordenação Temática de Genética
Fernando Roberto G. Silveira	Biólogo, Dr.	Coord. Temática de Avistagem Aérea
Marcos R. Rossi dos Santos	Biólogo, Dr.	Coord. Temática de Bioacústica
Marta Jussara Cremer	Bióloga, Dra.	Coord. Temática de Telemetria
Outros Responsáveis Técnicos		
Alexandre Douglas Paro	Biólogo, Me.	Processamento e Análise de MAP
Angela de Lucca R. Wagener	Química, Dra.	Discussão Resultados Análises Químicas
David Haas	Engenheiro, PhD student	Processamento Análise dos dados dos DTAGs
Fábio Daura-Jorge	Biólogo, Dr.	Foto Identificação
Vitor Zimmermann	Geógrafo	Sist. Gerenc. Dados e Geoprocessamento/SIG

EQUIPE DE ELABORAÇÃO DO GUIA DE ESPÉCIES

Nomes	Formação	Atuação
Leonardo Liberali Wedekin	Biólogo, Dr.	Coordenação e Produção textual
Alexandre Douglas Paro	Biólogo, Me.	Produção textual
Ana Lúcia Cypriano de Souza	Bióloga, Dra.	Produção textual
Clarêncio Baracho	Biólogo, Me	Produção textual
Fábio Daura-Jorge	Biólogo, Dr.	Produção textual
Fernando Roberto G. Silveira	Biólogo, Dr.	Produção textual
Karina Groch	Bióloga, Dra.	Produção textual
Larissa Dalpaz	Bióloga	Revisão e formatação
Marcela Meyer	Bióloga	Revisão e formatação
Marcos R. Rossi dos Santos	Biólogo, Dr.	Produção textual
Maria Eduarda Aquino	Eng ^a Sanitarista e Ambiental	Elaboração de Mapas
Marta Jussara Cremer	Bióloga, Dra.	Produção textual
Matheus Caiaffa	Estagiário Oceanografia	Revisão e formatação
Vitor Zimmermann	Geógrafo	Elaboração de Mapas

INTRODUÇÃO

Os cetáceos são um dos grupos de mamíferos mais derivados, tendo sofrido uma série de adaptações para uma vida exclusivamente aquática. Esse grupo se originou de um grupo de mamíferos terrestres há aproximadamente 50 milhões de anos (THEWISSEN & WILLIAMS, 2002). A transição dos cetáceos ancestrais do ambiente terrestre para o aquático é um dos casos de macroevolução mais bem documentado no registro fóssil (ZIMMER, 1998; RICE, 2002). O formato atual do corpo dos cetáceos surgiu no período Eoceno (35 m.a.), com o desaparecimento quase completo dos membros posteriores (patas traseiras), formato fusiforme do corpo e diversas outras adaptações ao ambiente aquático (BERTA et al., 2015). Desde então, o grupo irradou-se para explorar todos os ambientes aquáticos, desde regiões marinhas oceânicas e costeiras, incluindo grandes bacias hidrográficas; habitam desde mares polares até as regiões tropicais do mundo.

Dois grupos de cetáceos viventes são reconhecidos (RICE, 2002): Subordem Mysticeti (baleias verdadeiras de barbatanas) e Subordem Odontoceti (baleias e golfinhos com dentes). Os mysticetos possuem dois orifícios respiratórios, estruturas queratinizadas na boca (barbatanas) que funcionam como um filtro usado na alimentação e se destacam por estarem entre os maiores animais que já viveram no planeta. Os odontocetos usam os dentes para se alimentar e constituem o grupo mais diversificado, com uma ampla variação de tamanho e formato de corpo.

Considerando que a taxonomia é uma ciência dinâmica, o número de espécies de cetáceos atuais varia de 78 a mais de 91 espécies dependendo do autor. Estas espécies estão distribuídas em 13 ou 14 famílias (RICE, 1998; 2002; SHIRIHAI & JARRET, 2006; JEFFERSON et al., 2015). No Brasil, 45 espécies de cetáceos foram registradas até o momento (LODI & BOROBIA, 2013).

Um dos principais descritores de habitat dos cetáceos é a profundidade, e a variação da profundidade é um dos fatores responsáveis por estruturar as comunidades de cetáceos do mundo. Podem-se dividir as espécies de cetáceos em grupos de acordo com as profundidades utilizadas: (a) animais costeiros; (b) animais da plataforma continental; (c) cetáceos do talude; e (d) cetáceos de regiões oceânicas. Além disso, algumas espécies podem viver ou usar em diferentes momentos das suas vidas mais de um ambiente. Abaixo seguem as profundidades utilizadas pelos cetáceos na Bacia de Santos

(Figura I). A figura foi construída com base nas profundidades observadas de cada espécie na Bacia de Santos.

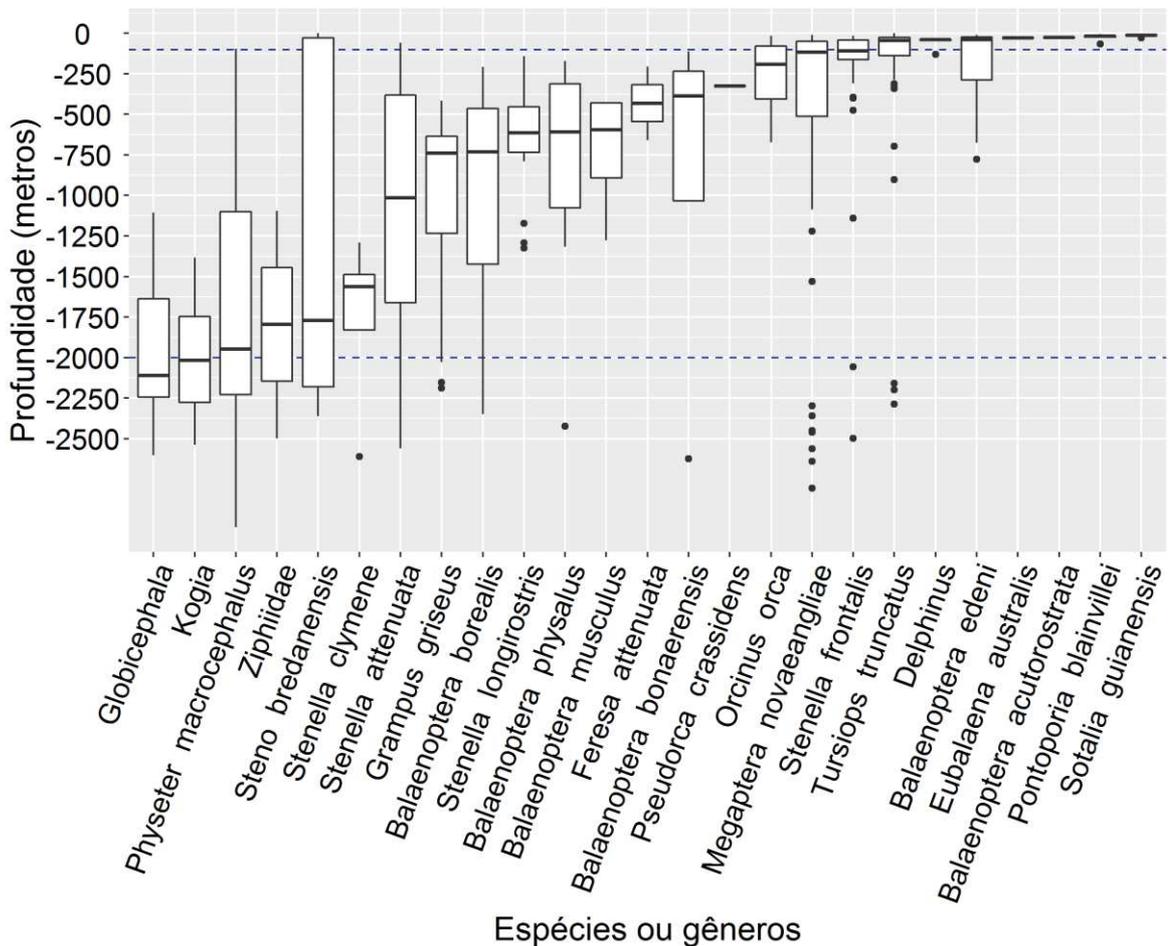


Figura I: Profundidades utilizadas pelas espécies ou gêneros de cetáceos observados na Bacia de Santos durante o PMC. Linha tracejada azul mostra o limite da plataforma e talude continental (isóbata dos 200 m) e o limite do talude continental com as regiões oceânicas (2.000 m).

Com base nesses mesmos dados de profundidades de cada espécie, foram gerados mapas de distribuição potencial e habitats críticos das espécies com mais de 4 observações. Para a distribuição potencial, foram usados os quantis de 5 e 95% como limite dos polígonos. Para os habitats críticos, foram usados os quantis de 25 e 75%.

I. MYSTICETI

I.1 Família Balaenidae

Compreende as baleias-francas e a baleia-da-Groelândia, totalizando quatro espécies em dois gêneros (*Eubalaena* e *Balaena*). Caracterizam-se pela grande cabeça que chega a ter um terço do tamanho do corpo e uma boca bastante recurvada. Seu corpo é mais robusto que os dos balaenopterídeos (Família Balaenopteridae) e os ossos cervicais são fusionados. As baleias desta família não possuem nadadeira dorsal nem pregas ventrais.

I.1.1 Baleia-franca (*Eubalaena australis*)

Quadro I.1.1-1: Descrição da baleia-franca, *Eubalaena australis*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenidae
Baleia-franca, <i>Eubalaena australis</i> Desmoulins, 1822	
Tamanho adulto: até 17 metros	Peso adulto: até 80.000 kg
Tamanho filhote: 4 - 5 metros	Peso filhote: 1.000 kg (ao nascer)
Distribuição: Águas tropicais até polares, compreendendo latitudes normalmente entre 20°S e 55°S, podendo chegar até 65°S	
Caracteres diagnósticos: espécie de grande porte e corpo robusto, seu formato largo apresenta uma cabeça extremamente grande, podendo compreender um terço do tamanho do seu corpo; a linha da boca é bem curvada e o rostró é arqueado e extremamente estreito quando visto de cima; não apresenta nadadeira dorsal ou qualquer vestígio; nadadeira peitoral grande e em formato de pá (trapezoidal); nadadeira caudal suave e ampla; coloração preta ao longo de praticamente todo o corpo, mas a maioria apresenta manchas brancas na barriga e no queixo; apresenta calosidades na cabeça.	
Comportamento: realizam migração no inverno para se alimentar; costumam ser lentas; eventualmente realizam batidas de cauda na superfície da água ou saltos; podem ficar com o ventre para cima expondo a nadadeira peitoral; por vezes levantam sua nadadeira caudal enquanto nadam ou, bem menos frequentemente, expõem a caudal de forma estática acima da superfície; podem permanecer bem próximo da costa, perto da arrebentação, nas suas áreas de reprodução.	
Uso de habitat: nas áreas de reprodução, se concentram em regiões rasas, e próximas da costa, muitas vezes próximas da arrebentação.	
Tamanho de grupo geralmente de 2-3 animais, chegando até 12 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Baixo risco	Status MMA (2014): Vulnerável

Características. Corpo robusto de coloração preta, chegando a medir até 17 metros de comprimento. As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos. Não possuem nadadeira dorsal. Podem possuir manchas brancas de formato variável na parte ventral entre a nadadeira peitoral e o ânus. Sua cabeça é grande, chegando a um terço do comprimento do corpo. Possuem calosidades na cabeça que permitem a sua identificação individual. A nadadeira peitoral tem o formato de trapézio. O borrifo tem formato de “V”. Os filhotes geralmente nascem

pretos, mas podem eventualmente apresentar albinismo parcial, com grande parte do corpo branco ou acinzentado claro, ou ainda branco com manchas pretas. A coloração torna-se mais escura após o primeiro ano de vida.

Espécies similares. Seu corpo robusto, sem nadadeira dorsal e com calosidades na cabeça são características bastante distintivas que tornam a identificação relativamente fácil. Os balaenopterídeos de grande porte possuem o corpo mais fusiforme, possuem nadadeira dorsal e pregas ventrais.

Distribuição. Distribui-se pelo Hemisfério Sul em regiões circumpolares, realizando migrações anuais entre as áreas de alimentação e reprodução, onde permanecem durante o inverno e primavera. No Brasil, concentra-se em regiões costeiras da região Sul, especialmente no litoral sul de Santa Catarina (SIMÕES-LOPES et al., 1992). Registros também foram feitos na região Sudeste (LODI et al., 1996) e Nordeste até o Estado da Bahia (BARACHO et al., 2002).

População. Não existem estimativas populacionais para a baleia-franca-austral no Brasil, mas existem fortes evidências que a população esteja crescendo nas últimas décadas (GROCH et al., 2005).

Comportamento. A espécie tem nado lento e pode ficar em uma mesma área em descanso, próximo da arrebentação. Pode adentrar eventualmente canais ou baías. Eventualmente também pode apresentar comportamentos mais vigorosos como salto e batida de nadadeira peitoral ou caudal. Pode expor a cauda antes de um mergulho ou mesmo permanecer com a cauda ereta e parada para fora da água.

Registros no PMC-BS. A baleia-franca foi rara durante o PMC-BS, com um único registro realizado por avistagem na 4ª Campanha de Telemetria. O grupo era formado por 3 indivíduos adultos e foi registrado na plataforma continental próximo de São Francisco do Sul/SC (**Figura I.1.1-1**).



Figura I.1.1-1: Baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) observada na Bacia de Santos.

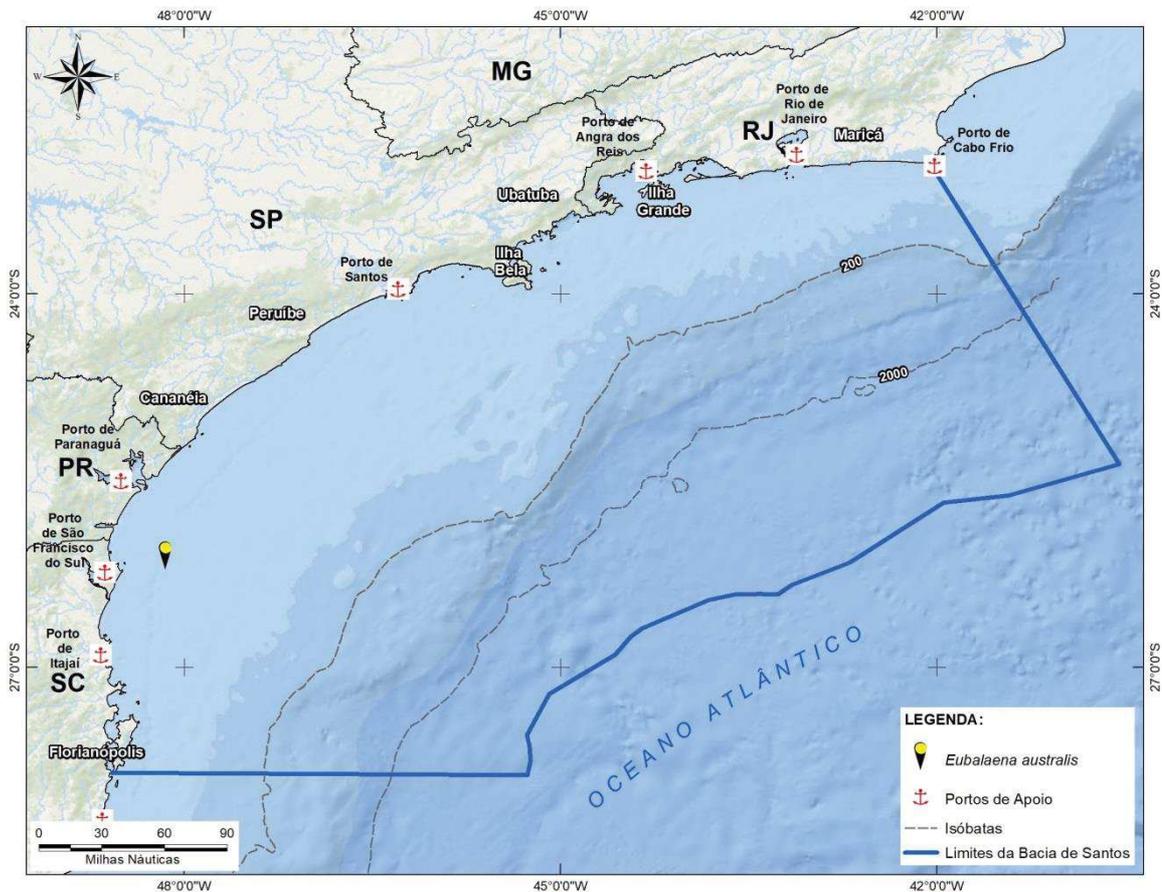


Figura I.1.1-2: Localização do registro de *Eubalaena australis* em 2017 durante a campanha do PMC-BS.

I.2 Família Balaenopteridae

A família Balaenopteridae compreende o grupo de mysticetos vivos mais diverso taxonomicamente e morfologicamente. Inclui oito (ou possivelmente nove) espécies em dois gêneros, *Balaenoptera* e *Megaptera* (DEMÉRÉ et al., 2005). A principal característica dos balaenopterídeos é a presença de pregas ventrais longitudinais que se estendem desde a parte inferior da boca quase até o umbigo (extensão difere de acordo com a espécie) (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015). Os membros dessa família também são conhecidos como rorquais, com exceção da baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*). A palavra "rorqual" tem origem norueguesa (*rorkval*) e significa "baleia-vermelha",

referindo-se à cor avermelhada das pregas ventrais quando distendidas pela presença de numerosos vasos sanguíneos na região (LODI & BOROBIA, 2013).

Os balaenopterídeos possuem o corpo esguio (baleia-jubarte um pouco menos) e hidrodinâmico, a cabeça plana e triangular (refletindo a estrutura do crânio), e a nadadeira dorsal (varia em tamanho e forma) localizada atrás do meio do corpo, sendo geralmente mais rápidos que os outros mysticetos. Além disso, as barbatanas são curtas e largas e, conseqüentemente, a mandíbula superior não é fortemente arqueada como nas outras baleias. O número e a relação largura/comprimento das barbatanas, juntamente com a densidade das franjas, são caracteres de diagnóstico das espécies. Em virtude da sua morfologia, os rorquais apresentam uma especialização notável que é a estratégia de alimentação por engolfamento, a qual envolve a distensão das pregas ventrais permitindo a ampliação da cavidade bucal, e a contenção de grande quantidade de água e alimento, que é filtrado pelas barbatanas com a expulsão da água (DEMÉRÉ et al., 2005; LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

A distribuição dos balaenopterídeos é mundial, sendo que a maioria dos membros da família é encontrada em todos os oceanos. No entanto, a baleia-minke-Antártica (*B. bonaerensis*) é encontrada somente nos oceanos do Hemisfério Sul, e a baleias-de-Bryde (*B. edeni* e *B. brydei*) estão ausentes das águas frias do Ártico e da Antártica, sendo as únicas espécies que não realizam migrações de longa distância entre as áreas de reprodução nas baixas latitudes e áreas de alimentação nas altas latitudes. Em todos os membros da família, as fêmeas são levemente maiores que os machos, e os animais no Hemisfério Sul tendem a ser maiores que aqueles no Hemisfério Norte (BRODIE, 1975).

Com base na nadadeira peitoral distinta da baleia-jubarte em relação aos balaenopterídeos de peitoral curto, a família está dividida em duas subfamílias, Balaenopterinae (baleia-azul, *B. musculus*; baleia-fin, *B. physalus*; baleia-sei, *B. borealis*; baleia-de-Bryde, *B. edeni*; baleia-de-Omura, *B. omurai*; baleia-minke-comum, *B. acutorostrata*; baleia-minke-Antártica, *B. bonaerensis*) e Megapterinae (*M. novaeangliae*) (DEMÉRÉ et al., 2005). Subespécies têm sido descritas para quatro balaenopterídeos: *B. musculus*, *B. borealis*, *B. acutorostrata*, e *B. edeni*, essa última, apesar de o Comitê em Taxonomia de Mamíferos Marinhos

considerar duas subespécies (*B. edeni edeni* e *B. edeni brydei*), tem sido reconhecida como espécie distinta de *B. brydei* por causa dos caracteres morfológicos e genéticos (WADA et al., 2003).



Figura I.2-1: Salto parcial de uma baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) observada na Bacia de Santos.

I.2.1 Baleia-azul (*Balaenoptera musculus*)

Quadro I.2.1-1: Descrição da baleia-azul, *Balaenoptera musculus*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-azul, <i>Balaenoptera musculus</i> Linnaeus, 1758	
Tamanho adulto: até 33 metros	Peso adulto: até 180.000 kg
Tamanho filhote: 7 - 8 metros	Peso filhote: até 3.000 kg
Distribuição: Águas circumpolares durante a alimentação e tropicais/subtropicais durante a reprodução.	
Caracteres diagnósticos: maior espécie de mysticeto, chegando a 33 metros de comprimento; nadadeira dorsal relativamente pequena e com forma variável, de falcada a triangular ou pontuda; cabeça larga e em forma de U quando vista de cima e achatada quando vista de lado; coloração dorsal cinza azulada com pequenas manchas claras no dorso e flanco, que variam de tamanho e densidade; cabeça uniformemente azul.	
Comportamento: apesar de mergulhos curtos serem mais comuns, podem permanecer por 20-30 minutos submersas; não costumam se locomover na superfície; nado rápido; podem saltar ou bater a cabeça quando perseguidas por embarcações por muito tempo.	
Uso de habitat: são animais essencialmente oceânicos de águas abertas, mas podem eventualmente chegar próximo da costa ou usar águas do talude continental para se alimentar ou reproduzir.	
Tamanho de grupo 1-3 indivíduos, chegando a 50 animais nas áreas de alimentação.	
Status IUCN (2018): Em perigo	Status MMA (2014): Criticamente ameaçada

Características. O maior animal que já existiu na face da Terra, chegando a atingir 33 metros de comprimento. Possui um borriço alto e colunar, alcançando de 9 a 12 metros de altura. A cabeça é grande, em formato de “U”, e o orifício respiratório é protuberante. Nadadeira dorsal relativamente pequena e com formato variável, geralmente falcada e pontuda, fica posicionada bem atrás do corpo. A coloração é cinza azulada com pequenas manchas ovaladas claras no dorso e flancos de tamanho e formato variável e coloração mais clara. São reconhecidas pelo menos cinco subespécies (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. Pode ser confundida com os outros grandes balaenopterídeos, como a baleia-fin e baleia-sei, mas sua coloração e formato da nadadeira dorsal (relativamente menor que as outras baleias) são facilmente distinguíveis e podem confirmar a identificação.

Distribuição. Distribui-se por todos os oceanos do mundo. No Brasil, existem poucas informações sobre a espécie, sendo que existem somente três registros (um macho e uma fêmea na região Nordeste, e uma fêmea em Cabo Frio) de capturas entre os anos de 1948 e 1965 (LODI & BOROBIA, 2013). Os registros mais recentes foram de uma fêmea encalhada viva no Estado do Rio Grande do Sul em 1992 (DALLA-ROSA & SECCHI, 1997) e duas avistagens no Rio Grande do Norte em 2012 (OLIVEIRA et al., 2015).

População. Existem poucas informações sobre as populações de baleia-azul no Brasil e no mundo, que foram quase extintas por causa da caça comercial. No Brasil, a espécie é considerada rara (ZERBINI et al., 1997). No Hemisfério Norte, ocorre uma subespécie (*B. musculus musculus*) nos oceanos Atlântico e Pacífico, e no Hemisfério Sul, ocorrem duas subespécies reconhecíveis: a baleia-azul-Antártica (*B. musculus intermedia*) e a baleia-azul-pigméia (*B. musculus brevicauda*). Embora recentes estudos moleculares tenham diferenciado as baleias-azuis amostradas na Antártica, no Oceano Índico e no leste do Oceano Pacífico, os limites das populações no Hemisfério Sul não são bem compreendidos (LEDUC et al., 2007; TORRES-FLOREZ et al., 2014; LEDUC et al., 2017).

Comportamento. As baleias-azuis tendem a passar os meses de inverno em áreas de alta produtividade, como as águas circumpolares da Antártica, as quais servem como áreas de alimentação (BRANCH et al., 2007). A espécie tem natação rápida e o intervalo de mergulho relativamente longo, entre 15 e 25 minutos. Pode realizar saltos e batida de cabeça quando perseguida por muito tempo por uma embarcação. A cabeça desaparece após a respiração e o dorso torna-se visível com a nadadeira dorsal. São observadas sozinhas ou em dupla, mas concentrações de até 50 indivíduos podem ser observadas nas áreas de alimentação.



Figura I.2.1-1: Baleia-azul (*Balaenoptera musculus*) observada na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. A baleia-azul foi registrada somente no segundo ano do PMC-BS, durante a 4ª Campanha de Telemetria realizada no segundo semestre de 2017. Durante a Campanha, foram registradas quatro avistagens de indivíduos solitários, adultos, e dois desses foram vistos na mesma área e se juntaram em um grupo algum tempo depois. Todos os registros ocorreram no talude (**Figura I.2.1-2**).

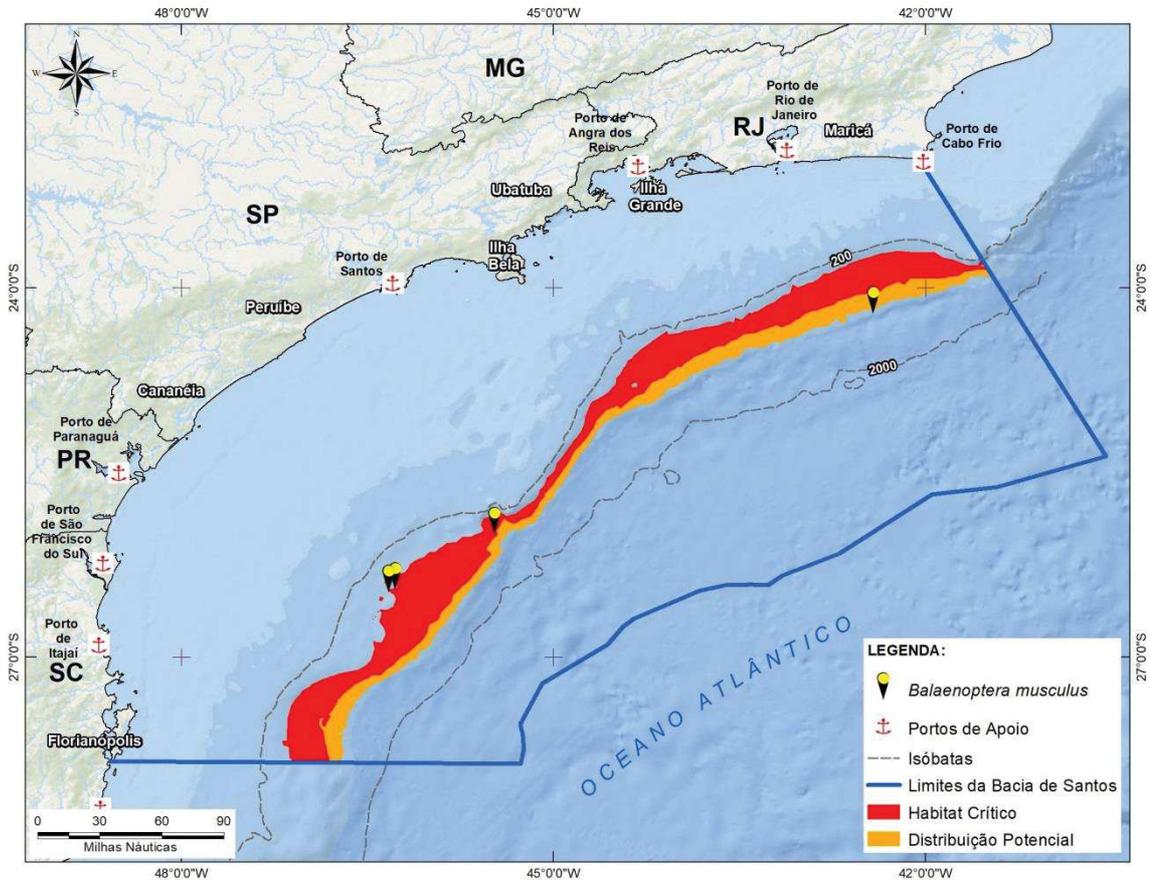


Figura I.2.1-2: Localização dos registros de *Balaenoptera musculus* nas campanhas do PMC-BS.

1.2.2 Baleia-fin (*Balaenoptera physalus*)

Quadro 1.2.2-1: Descrição da baleia-fin, *Balaenoptera physalus*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-fin, <i>Balaenoptera physalus</i> Linnaeus, 1758	
Tamanho adulto: até 27 metros	Peso adulto: até 120.000 kg
Tamanho filhote: 6 - 6,5 metros	Peso filhote: até 3.000 kg
Distribuição: Águas oceânicas tropicais, temperadas a circumpolares de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: segunda maior espécie de mysticeto, chegando a 27 metros de comprimento; nadadeira dorsal proeminente e falcada que surge do dorso do animal num ângulo mais raso que em outros Balaenopterídeos; cabeça triangular com uma crista central bem desenvolvida; coloração da mandíbula assimétrica, com o lado direito branco e esquerdo escuro.	
Comportamento: aparentemente são mais sociais que outros Balaenopterídeos, formando grandes agregações; são indiferentes em relação à presença de barcos, não se aproximam nem os evitam.	
Uso de habitat: usam principalmente águas oceânicas e do talude continental.	
Tamanho de grupo: 1-20 baleias, podendo chegar a mais de 100 baleias nas áreas de alimentação.	
Status IUCN (2018): Em perigo	Status MMA (2014): Em perigo

Características. A baleia-fin (*Balaenoptera physalus*) é a segunda maior espécie de mysticeto, atingindo até 27 metros de comprimento. Possui um corpo delgado e fusiforme, e a cabeça tem formato triangular, com a presença de uma única e bem desenvolvida crista longitudinal. O borrifo é alto (4 – 6 metros) e colunar. Sua principal característica diagnóstica é a coloração, que varia do negro ao cinza amarronzado no dorso e nas laterais, clareando de forma tênue na região ventral. Entretanto, a característica mais marcante é a coloração assimétrica da cabeça; a lateral esquerda da sua mandíbula acompanha a coloração do seu dorso enquanto a região lateral direita é branca. A espécie também possui faixas irregulares de coloração mais clara (“chevrons”) atrás da cabeça. A nadadeira dorsal é alta, falcada e surge do dorso do animal num ângulo

mais raso quando comparada a outros Balaenopteridae (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. A baleia-fin pode ser confundida com a baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), baleia-sei (*Balaenoptera borealis*), baleia-de-Bryde (*Balaenoptera edeni*) e baleia-de-Omura (*Balaenoptera omurai*). A visualização da parte superior da cabeça sem as quilhas laterais pode eliminar a baleia-de-Bryde. A coloração assimétrica das mandíbulas e o formato da nadadeira dorsal, que emerge suavemente do dorso (em um ângulo pequeno), podem confirmar a identificação. Em relação aos outros balaenopterídeos menores, o borrifo e o tamanho da baleia-fin podem ajudar na identificação, mas não são caracteres diagnósticos e devem ser usados em conjunto com outras características distintivas citadas acima.

Distribuição. Distribui-se por todo o mundo, especialmente nas regiões oceânicas. Aparentemente é uma espécie migratória como a maioria dos membros da Família Balaenopteridae, porém seus movimentos são complexos e não seguem um padrão definido. Em regiões como no Golfo da Califórnia, leste do Mar da China e no Mar Mediterrâneo, tendem a ser residentes e realizar pequenas movimentações (LODI & BOROBIA, 2013).

População. A espécie foi caçada até quase a extinção em todos os mares do mundo. Na região de Cabo Frio, no Rio de Janeiro, 84 baleias-fins foram capturadas em quatro anos de caça (WILLIAMSON, 1975). Na antiga área de caça comercial de Costinha, Estado da Paraíba, foram registradas poucas capturas em 48 anos de caça entre 1910 e 1974 (WILLIAMSON, 1975) e avistadas apenas nove baleias-fin entre os anos de 1980 e 1986 (ANTONELLI et al., 1987). Atualmente, no Brasil, a espécie é considerada rara (LODI & BOROBIA, 2013). Os registros mais recentes da espécie são escassos e ocorreram na Bacia de Santos em 2010, onde dois indivíduos foram observados próximos a uma plataforma de petróleo (LODI & BOROBIA, 2013), e próximos à Ilha de Trindade, onde dois indivíduos adultos foram observados a menos de 1 km da ilha (WEDEKIN et al., 2014). DI TULLIO et al. (2016) registraram apenas um indivíduo na região Sul e seis indivíduos na região Sudeste após realizar oito cruzeiros na região do talude continental entre os anos de 2009 e 2014.

Comportamento. Tendem a formar grupos de 2 a 20 indivíduos, podendo chegar a 100 indivíduos em áreas de alimentação. Nas áreas de alimentação, elas podem formar grandes agregações com outras espécies de baleias, como a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) e a baleia-azul (*Balaenoptera musculus*) (SHIRIHAI & JARRET, 2006; JEFFERSON et al., 2015).



Figura I.2.2-1: Baleias-fin (*Balaenoptera physalus*) observadas na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Durante o primeiro ano do PMC-BS, houve três registros de baleia-fin, enquanto no segundo, mais frequentes, foram registradas quatorze vezes. No terceiro ano, houve apenas um registro, o único de indivíduo solitário. Todos os outros registros foram de grupos pequenos, de dois a seis indivíduos, e somente um filhote foi avistado junto ao maior grupo registrado no segundo ano, que totalizava 6 indivíduos. A distribuição ocorreu majoritariamente

em área de talude, com exceção de dois registros efetuados em região oceânica, um deles o indivíduo solitário registrado no terceiro ano (**Figura I.2.2-2**).

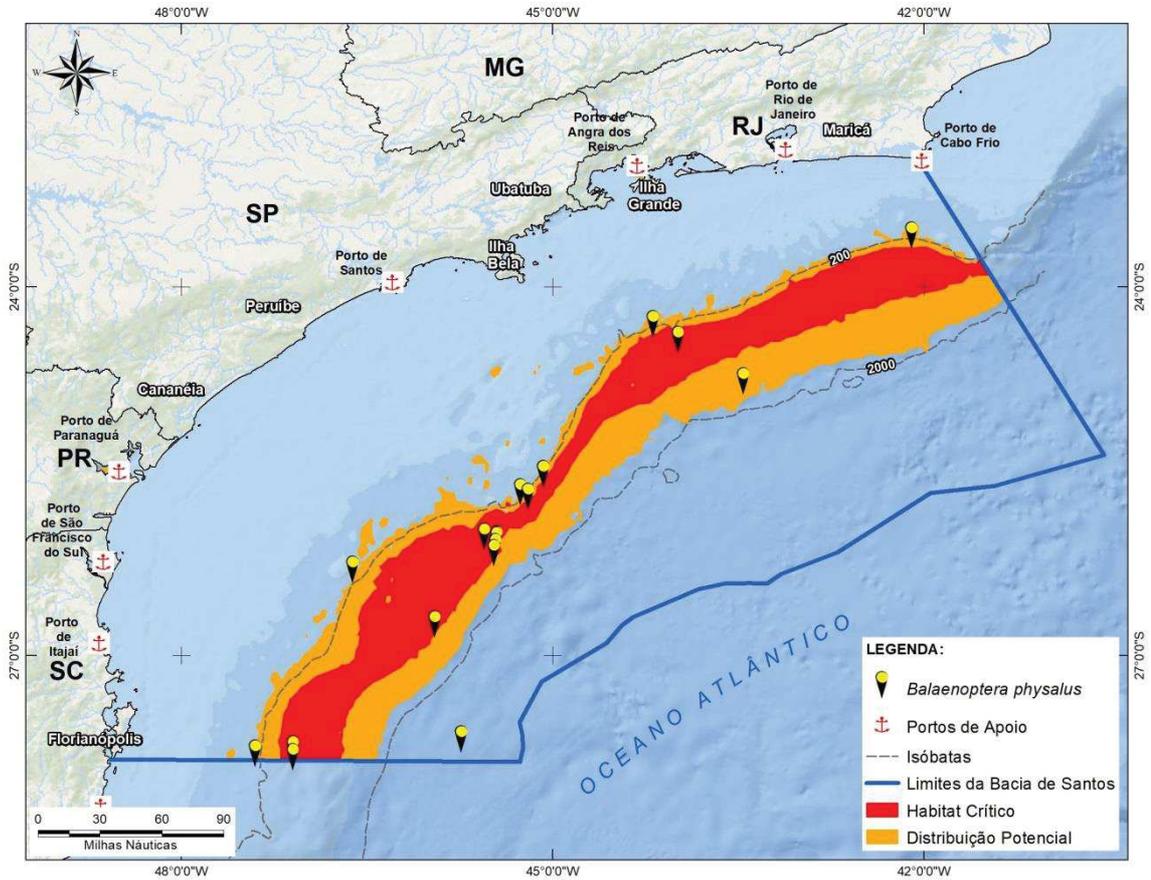


Figura I.2.2-2: Localização dos registros de *Balaenoptera physalus* nas campanhas do PMC-BS.

I.2.3 Baleia-sei (*Balaenoptera borealis*)

Quadro I.2.3-1: Descrição da baleia-sei, *Balaenoptera borealis*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-fin, <i>Balaenoptera borealis</i> Lesson, 1828	
Tamanho adulto: até 19,5 metros	Peso adulto: até 45.000 kg
Tamanho filhote: 4,5 a 4,8 metros	Peso filhote: até 780 kg
Distribuição: Águas oceânicas tropicais, temperadas a circumpolares de todos os oceanos, mas principalmente nas zonas temperadas de médias latitudes.	
Caracteres diagnósticos: corpo esguio; nadadeira dorsal alta, falcada e que muitas vezes tem um eixo “articulado”; cabeça pontiaguda levemente arqueada para baixo, com uma quilha central mediana; coloração cinza-escura ou amarronzada no dorso e região ventral clara. Pode apresentar manchas pálidas (pinceladas) na região dorsal e lateral.	
Comportamento: geralmente não arqueia o corpo durante um mergulho; a nadadeira dorsal e o borribo são vistos quase simultaneamente; a nadadeira dorsal e o dorso podem permanecer visíveis na superfície por períodos prolongados; podem se deslocar próximo à superfície expondo apenas a nadadeira dorsal.	
Uso de habitat: ocorre primariamente em águas oceânicas.	
Tamanho de grupo: 1-5 baleias, podendo chegar a mais de 50 baleias nas áreas de alimentação.	
Status IUCN (2018): Em perigo	Status MMA (2014): Em perigo

Características. A baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) é a terceira maior espécie da Família Balaenopteridae, atingindo até 19,5 metros de comprimento, embora seja mais comum encontrar indivíduos adultos medindo entre 12 a 17 metros, sendo as fêmeas ligeiramente maiores que os machos. Possui um corpo esguio com uma coloração predominantemente cinza-escura ou amarronzada, com um sombreamento claro na região ventral. Pode apresentar manchas irregulares em forma de pinceladas na cor clara ou pálida na região dorsal, chegando até as laterais. Sua cabeça é pontiaguda (vista de cima) e sua extremidade é ligeiramente arqueada para baixo (vista de lado). Possui uma única quilha longitudinal na parte superior da cabeça. A nadadeira dorsal alta e falcada está posicionada a cerca de 2/3 do comprimento total do corpo, e muitas vezes

aparenta ter o seu eixo “articulado” em relação à nadadeira dorsal de outros membros da Família Balaenopteridae (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. A baleia-sei é parecida em aparência externa com a baleia-fin (*Balaenoptera physalus*), a baleia-de-Omura (*Balaenoptera omurai*), e principalmente com a baleia-de-Bryde (*Balaenoptera edeni*), sendo que ambas espécies possuem uma proeminente nadadeira dorsal falcada e o típico corpo esguio das rorquais. O tamanho do corpo e a coloração assimétrica na mandíbula das baleias-fin e a presença das quilhas laterais na parte superior da cabeça das baleias-de-Bryde ajudam a distinguir essas duas espécies das baleias-sei. Além disso, a extremidade da cabeça arqueada para baixo e a posição da nadadeira dorsal podem ajudar na identificação da baleia-sei (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

Distribuição. A baleia-sei é uma espécie cosmopolita e ocorre desde os trópicos até regiões polares de todos os oceanos, mas principalmente nas zonas temperadas de médias latitudes. As baleias-sei são, em grande parte, baleias oceânicas, sendo raramente vistas perto da costa. Entretanto, sua distribuição no mundo é pouco conhecida, principalmente pelo fato desta espécie ter sido confundida durante muito tempo com a baleia-de-Bryde (*Balaenoptera edeni*). Além disso, a baleia-sei possui um padrão de ocorrência imprevisível, sendo observada em uma área durante vários anos e podendo desaparecer em seguida (JEFFERSON et al., 2015; LODI & BOROBIA, 2013). Sabe-se, entretanto, que realiza migrações latitudinais, como a maioria dos misticetos (SHIRIHAI & JARRET, 2006). O único trabalho usando telemetria satelital com essa espécie no Atlântico Norte verificou uma migração de 4.102 km de distância, entre a Ilha Faial (Açores) e as águas produtivas do mar de Labrador (OLSEN et al., 2009).

População. Existem diferenças genéticas entre as formas do Hemisfério Norte e Sul (reconhecidas como duas subespécies pela Sociedade de Mamíferos Marinhos), e para fins de manejo, são consideradas três populações tanto no Atlântico Norte quanto no Pacífico Norte e seis populações no hemisfério sul. No Brasil, a espécie foi abundante nos registros de capturas em Costinha, na Paraíba (ZERBINI et al., 2004a). Segundo WILLIAMSON (1975), 3.600 baleias-sei foram caçadas até 1974 no Nordeste do Brasil. Levantamentos realizados nesta antiga

área de caça, no período de 1998 a 2001, registraram apenas dois indivíduos (ANDRIOLO et al., 2010a). Sua ocorrência é considerada ocasional (LODI & BOROBIA, 2013) e nada se conhece sobre sua estrutura genética, seus movimentos e padrão de migração na costa do Brasil. DI TULLIO et al. (2016) registraram apenas um indivíduo após realizar oito cruzeiros na região do talude continental entre os anos de 2009 e 2014 ao longo das regiões Sudeste e Sul do Brasil.

Comportamento. Tendem a arquear menos o dorso que os outros rorquais na superfície da água e, por isso, a nadadeira dorsal e o orifício respiratório permanecem visíveis acima da água ao mesmo tempo. Possuem uma natação rápida (podendo atingir uma velocidade superior a 56 km/h) e raramente exibem a nadadeira caudal durante o mergulho. Tendem a formar grupos de 1 a 5 indivíduos, embora grandes agregações contendo até 50 indivíduos possam ser observadas em áreas de alimentação (LODI & BOROBIA, 2013).



Figura I.2.3-1: Baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) observada na Bacia de Santos.



Figura I.2.3-2: Baleias-sei (*Balaenoptera borealis*) observadas na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. A baleia-sei foi frequente durante as campanhas do PMC-BS com 29 registros. As avistagens foram feitas especialmente na 2ª e 4ª Campanhas de Telemetria e na 5ª Campanha de Avistagem Embarcada e MAP, todas entre o mês de julho e o início de setembro. Durante os três anos, foram registrados indivíduos solitários, mas somente no primeiro e no terceiro, foram registrados grupos com mais de 5 indivíduos, sendo que os únicos filhotes registrados foram no terceiro ano, um junto a um grupo de 5 indivíduos e outro junto a um grupo de 10 indivíduos. Todos os registros ocorreram na região do talude continental (**Figura I.2.3-3**).

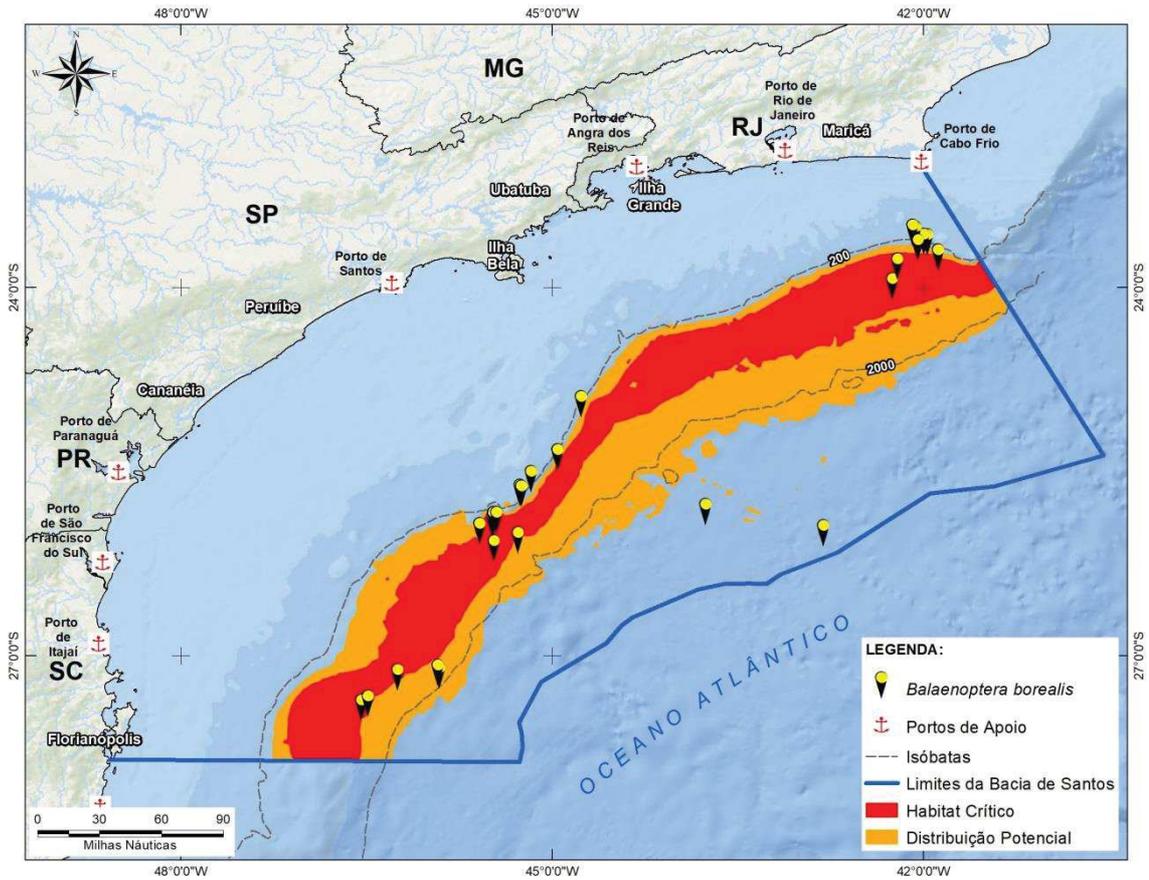


Figura I.2.3-3: Localização dos registros da baleia-sei (*Balaenoptera borealis*) durante o PMC-BS.

I.2.4 Baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*)

Quadro I.2.4-1: Descrição da baleia-de-Bryde, *Balaenoptera brydei*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-de-Bryde, <i>Balaenoptera brydei</i> Olsen, 1913 Sinônimo: <i>Balaenoptera edeni</i> Anderson, 1879	
Tamanho adulto: 15 a 16,5 metros	Peso adulto: até 25.000 kg
Tamanho filhote: até 4 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e temperadas de todos os oceanos. Entre as latitudes 40°S e 40°N.	
Caracteres diagnósticos: três quilhas proeminentes (uma central e duas laterais) no rosto; nadadeira dorsal alta, extremamente falcada e com a ponta afilada; nadadeira caudal larga com a borda posterior relativamente lisa; cabeça pontiaguda (rosto em forma de V).	
Comportamento: espécie não migratória, geralmente solitárias; quando mergulham geralmente arqueiam o dorso, mas não expõem a nadadeira caudal; capazes de nadar em velocidades de até 25 km/h, e podem mergulhar até 300 metros de profundidade.	
Uso de habitat: usa águas costeiras e oceânicas, muitas vezes concentrando-se no talude continental.	
Tamanho de grupo: 1-2 baleias, podendo chegar a 20 baleias.	
Status IUCN (2018): Deficiente em dados	Status MMA (2014): Deficiente em dados

Características. A principal característica diagnóstica da baleia-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*) é a presença de três quilhas proeminentes no rosto, sendo uma central e duas laterais. A nadadeira caudal é larga com a borda posterior relativamente lisa. A cabeça é pontiaguda, em forma de V, e representa 25% do comprimento do corpo. A nadadeira dorsal é alta, afastada do centro do dorso, extremamente falcada e com a ponta afilada. A coloração do corpo é cinza-escuro no dorso e branca na face ventral (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. A baleia-de-Bryde faz parte de um grupo conhecido como "complexo de baleias-de-Bryde", no qual duas formas são consideradas subespécies pelo Comitê em Taxonomia de Mamíferos Marinhos (2017): as

baleias menores (*B. edeni edeni*), que vivem em águas costeiras do leste do Oceano Índico e oeste do Oceano Pacífico, e as baleias maiores ou pelágicas (*B. edeni brydei*), que possuem uma distribuição global nos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico (RICE, 1998). No entanto, a Comissão Internacional da Baleia (IWC) continua a usar *B. edeni* para esse complexo de baleias, apesar de reconhecer que deve haver duas espécies (JEFFERSON et al., 2015). Recentemente, análises genéticas sugeriram que as baleias-de-Bryde que ocorrem nas águas do Peru, Chile e Brasil pertencem à espécie *Balaenoptera brydei* (PASTENE et al., 2015). As baleias-de-Bryde podem ser confundidas com outros balaenopterídeos como a baleia-sei (*B. borealis*), baleia-fin (*B. physalus*), baleia-de-Omura (*B. omurai*) e baleia-minke-antártica (*B. bonaerensis*) por causa das similaridades morfológicas. A visualização da parte superior da cabeça com as três quilhas é a principal característica distintiva para confirmar a identificação da baleia-de-Bryde.

Distribuição. É uma espécie da família Balaenopteridae que não realiza longas migrações, sendo encontrada em águas temperadas e tropicais de todos os oceanos, entre as latitudes 40°S e 40°N, tanto nas regiões costeiras quanto oceânicas (JEFFERSON et al., 2015).

Comportamento. Geralmente são vistas sozinhas ou em pares, mas podem formar grupos de 10 a 20 indivíduos quando em alimentação. Arqueiam o dorso quando mergulham, mas não expõem a nadadeira caudal. Costumam saltar com mais frequência que as outras espécies do gênero *Balaenoptera*, podendo projetar todo o corpo para fora da água. São capazes de nadar em velocidades de até 25 km/h e podem mergulhar a cerca de 300 metros de profundidade (JEFFERSON et al., 2015). Possuem uma dieta generalista. Consomem preferencialmente sardinha, anchova, cavala, arenque, pequenos crustáceos e cefalópodes. No Brasil, foram observadas se alimentando de sardinhas e anchovas (SICILIANO et al., 2004; LODI et al., 2015), sendo observadas com a boca aberta engolfando cardumes de pequenos peixes e com aves marinhas associadas. Momentos antes de dar um bote em um cardume de presas, as baleias-de-Bryde podem nadar lateralmente expondo o ventre mais claro e um dos lobos da nadadeira caudal.

População. Existem registros de ocorrência da espécie ao longo de toda costa brasileira, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul, mas principalmente nas regiões Sudeste e Sul durante o verão e o outono austral (ZERBINI et al., 1997; SICILIANO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2015; LODI et al., 2015). Dentre as espécies do gênero *Balaenoptera*, as baleias-de-Bryde são a segunda espécie com mais registros de encalhes ao longo da costa do Brasil (ZERBINI et al., 1997). Dados de um estudo genético realizado para oito amostras de baleia-de-Bryde do Brasil identificaram a espécie como sendo *B. brydei* (PASTENE et al., 2015). No entanto, não existem estimativas de abundância para a espécie no Brasil. São observadas com frequência em áreas associadas a ilhas costeiras, como os arquipélagos de Alcatrazes e São Sebastião, ilha da Queimada, Laje de Santos, ilhas Anchieta e Palmas, ilha da Marambaia e arquipélago de Santana (LODI & BOROBIA, 2013).



Figura I.2.4-1: Baleias-de-Bryde (*Balaenoptera brydei*) observadas na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, a baleia-de-Bryde foi registrada 16 vezes no primeiro ano do projeto, 27 vezes no segundo ano e 26 vezes no terceiro ano, totalizando 69 registros. Na maioria das vezes, foram registradas solitárias, mas algumas poucas vezes os registros foram de grupos com dois ou três indivíduos. Filhotes foram observados em diversas ocasiões em todos os anos. Os registros da espécie se concentraram no talude e em regiões próximas à costa, com ocasionais registros na plataforma continental. Somente um registro foi efetuado em região oceânica, ao sul da área de estudo. A distribuição foi homogênea ao longo das latitudes estudadas (**Figura I.2.4-2**).

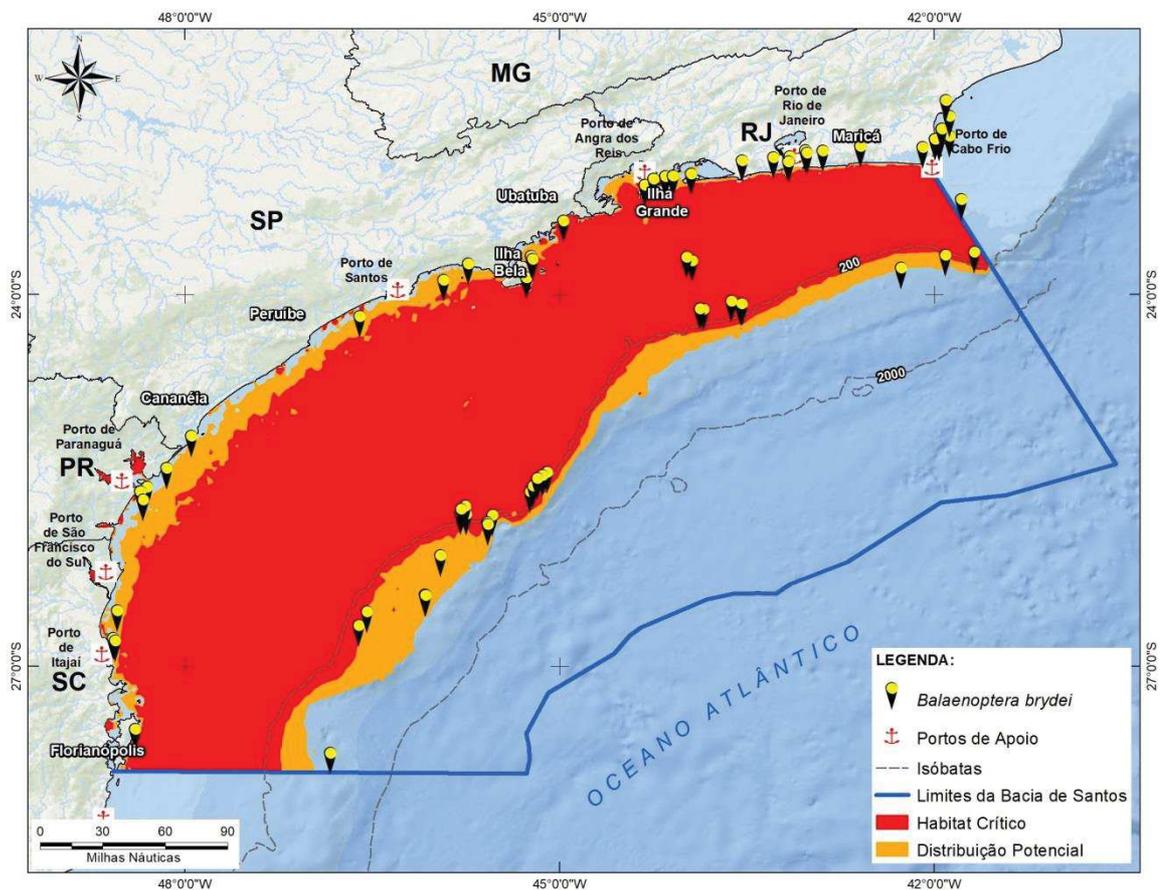


Figura I.2.4-2: Localização dos registros de *Balaenoptera brydei* durante o PMC-BS.

1.2.5 Baleia-minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*)

Quadro 1.2.5-1: Descrição da baleia-minke-anã, *Balaenoptera acutorostrata*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-minke-anã, <i>Balaenoptera acutorostrata</i> Lacépède, 1804	
Tamanho adulto: até 7,8 metros	Peso adulto: até 6.400 kg
Tamanho filhote: 2,4 a 2,8 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais, temperadas a circumpolares do Hemisfério Sul.	
Caracteres diagnósticos: menor espécie de balaenopterídeo; nadadeira dorsal falcada; cabeça triangular com uma quilha central; faixa branca na nadadeira peitoral estendendo-se nos flancos até o dorso com o final apontando para a frente.	
Comportamento: geralmente solitárias ou em pequenos grupos de até três indivíduos; podem mostrar comportamento curioso por barcos pequenos e banhistas/mergulhadores.	
Uso de habitat: plataforma e talude continental.	
Tamanho de grupo: 1-2 baleias, podendo chegar a 8 baleias.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. A baleia-minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*) é a menor espécie da família, atingindo apenas 7,8 metros de comprimento. Além de seu pequeno tamanho, a baleia-minke-anã é caracterizada pela cabeça triangular e pontiaguda, nadadeira dorsal falcada e posicionada aproximadamente a 2/3 do corpo. A faixa branca na nadadeira peitoral é o caractere diagnóstico que a distingue da baleia-minke-antártica (*Balaenoptera bonaerensis*) (SHIRIHAI & JARRET, 2006). Esta faixa branca pode até mesmo ser visível quando o animal está submerso, próximo à superfície. Apresenta manchas mais claras de formato variável na parte de trás da cabeça. Outra característica marcante, apesar de não ser diagnóstica para identificação da espécie, é o borrifo pouco aparente, diferente de outros balaenopterídeos (LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. Pode ser confundida com a baleia-minke-antártica, que sobrepõe sua distribuição com a da baleia-minke-anã, apesar de a última ser

observada principalmente na plataforma continental. A coloração branca na nadadeira peitoral distingue a baleia-minke-anã das outras espécies.

Distribuição. A espécie distribui-se amplamente em regiões tropicais, temperadas até a borda do gelo de regiões circumpolares nos dois hemisférios. No Hemisfério Sul, a baleia-minke-anã é considerada uma subespécie, separada de duas subespécies de baleia-minke do Hemisfério Norte. Nas regiões tropicais e subtropicais do Hemisfério Sul, ocupa geralmente regiões costeiras, plataforma continental e talude (JEFFERSON et al., 2015), mas seu padrão de distribuição e eventuais migrações são ainda pouco estudados e conhecidos.

População. Não existem estimativas globais para a baleia-minke-anã. Estudos consideram a existência de múltiplas populações no Hemisfério Sul (LODI & BOROBIA, 2013). São consideradas relativamente abundantes (SHIRIHAI & JARRET, 2006).

Comportamento. Os grupos desta espécie são geralmente pequenos (1-3) e foram observados relativamente perto do continente, em águas da plataforma continental (JEFFERSON et al., 2015). De maneira geral, a espécie pode ser observada durante o ano inteiro na costa brasileira, com picos de avistagem entre junho e setembro (ZERBINI et al., 1997). Entretanto, esta sazonalidade pode ser decorrente de esforço de pesquisa reduzido e restrito a regiões específicas da costa, pois aparentemente esta espécie não realiza grandes migrações, somente movimentos sazonais ao longo das plataformas continentais. A baleia-minke-anã é conhecida pelo seu comportamento curioso, frequentemente se aproximando de barcos e banhistas (MANGOTT et al., 2011). Também pode ser observada realizando comportamentos acrobáticos, como saltos que expõem o corpo totalmente fora da água.

Pouco se conhece a respeito das vocalizações da baleia-minke-anã no Atlântico Sul, sendo mais conhecidas as vocalizações da baleia-minke-comum no Hemisfério Norte (RANKING & BARLOW, 2005). No Hemisfério Sul, as vocalizações da baleia-minke-anã da Austrália foram descritas como sons estereotipados complexos, com unidades pulsadas e frequência modular, denominados de “star wars” (GEDAMKE et al., 2001).



Figura I.2.5-1: Baleia-minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*).

Registros no PMC-BS. Durante o PMC na Bacia de Santos, a baleia-minke-anã foi rara, com somente três registros. Todos ocorreram na plataforma continental adjacente ao Estado de São Paulo, em profundidades que variaram de 25 m a 52 m (**Figura I.2.5-2**). Na primeira ocasião, um indivíduo solitário deu vários saltos frontais seguidos. No último ano, foi registrada uma dupla de animais, sendo este o único registro com mais de um indivíduo.

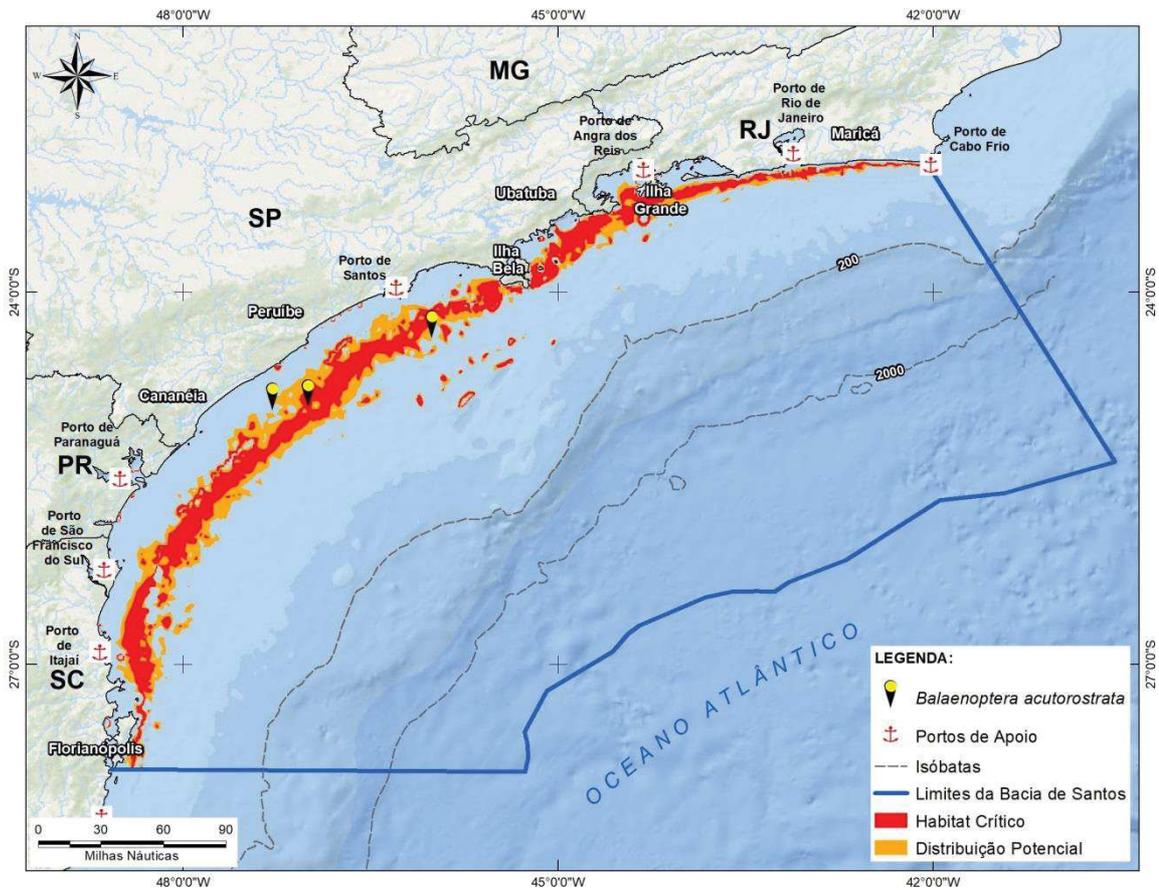


Figura I.2.5-2: Localização dos registros de *Balaenoptera acutorostrata* durante o PMC-BS.

I.2.6 Baleia-minke-antártica (*Balaenoptera bonaerensis*)

Quadro I.2.6-1: Descrição da baleia-minke-Antártica, *Balaenoptera bonaerensis*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-minke-antártica, <i>Balaenoptera bonaerensis</i> Burmeister, 1867	
Tamanho adulto: até 10,7 metros	Peso adulto: até 9.100 kg
Tamanho filhote: até 2,9 metros	Peso filhote: até 400 kg
Distribuição: Águas tropicais, temperadas a circumpolares do Hemisfério Sul.	
Caracteres diagnósticos: corpo delgado, com coloração do dorso preta ou cinza-escura e branca na região ventral, com riscas irregulares e/ou semicírculos acinzentados claros nas laterais; cabeça triangular e pontiaguda com uma única quilha central no topo do rostro; nadadeira peitoral acinzentada mais clara que o corpo, geralmente com uma borda escura; nadadeira dorsal falcada.	
Comportamento: geralmente solitárias ou em pares com agregações de até centenas de animais podendo ocorrer em áreas de alimentação; podem dar saltos e se deslocar rapidamente com saltos curtos semelhantes aos dos golfinhos; podem realizar comportamento de periscópio para verificar o entorno, e demonstram comportamento curioso por embarcações.	
Uso de habitat: áreas costeiras e oceânicas, com maior predominância nas últimas.	
Tamanho de grupo: 1-6 baleias.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. A baleia-minke-antártica (*Balaenoptera bonaerensis*) é uma das menores espécies de mysticetos, atingindo até 10,7 metros de comprimento. O corpo é delgado, com o dorso preto ou cinza-escuro e a região ventral é branca. As nadadeiras peitorais são cinzentas, mais claras que o corpo e podendo apresentar a borda escura. A cabeça é triangular e pontiaguda, com uma quilha central/mediana no topo do rostro. A nadadeira dorsal é falcada e está posicionada no final do segundo terço da região dorsal. O borrifo é reduzido e tende a ser discreto.

Espécies similares. A espécie pode ser confundida com a baleia-minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*), com a qual compartilha algumas características, como a cabeça em formato triangular e uma quilha central, além da nadadeira dorsal falcada. Entre as diferenças, a baleia-minke-antártica é maior que baleia-minke-anã em cerca de dois metros e a coloração do corpo é mais escura. O melhor caractere para diferenciação destas espécies é a nadadeira peitoral de cor cinza relativamente uniforme na baleia-minke-Antártica, diferente da baleia-minke-anã que apresenta uma faixa branca na nadadeira peitoral (JEFFERSON et al., 2015).

Distribuição. Ocorre principalmente nas águas costeiras e oceânicas do Hemisfério Sul, embora alguns indivíduos possam cruzar o equador. Embora haja uma tendência de migrar para o norte para reprodução durante o inverno, alguns indivíduos permanecem na região Antártica ao longo do ano. Os registros no Brasil foram realizados principalmente no inverno e na primavera, embora a espécie tenha sido avistada também em outras épocas do ano, sobre ou além do talude continental (ZERBINI et al., 2004a). As águas oceânicas ao largo da Paraíba parecem ser uma importante área de reprodução no Atlântico Sul Ocidental, porém há indicativos de que os nascimentos não ocorrem nessa área (LUCENA, 2006). Cruzeiros na região do talude da Bacia de Santos e Pelotas, realizados entre os anos de 2009 a 2014, registraram a espécie tanto na primavera como no outono (DI TULLIO et al., 2016), embora a frequência tenha sido baixa.

População. A espécie foi alvo da caça comercial durante várias décadas. Cerca de 100 mil baleias-minke foram capturadas por expedições pelágicas baleeiras na Antártica. Embora não exista uma estimativa de abundância geral, acredita-se que a população chegue a centenas de milhares de indivíduos (REILLY et al., 2008). Mais de 14 mil foram capturadas no Brasil entre as décadas de 60 a 80 a partir da estação de caça na Paraíba (HORWOOD, 1990). Em décadas recentes, avistagens e encalhes foram registrados em vários locais da costa brasileira (ZERBINI et al., 1997, 2004a; SANTOS et al., 2010). Desde 1987, a caça é proibida no Brasil, porém a captura continua sob a licença científica no âmbito da Comissão Internacional da Baleia (IWC).

Comportamento. Geralmente é encontrada em grupos de 1 a 6 indivíduos, mas agregações de até centenas de animais podem ocorrer em áreas de alimentação na Antártica. Não apresentam tantos comportamentos aéreos como outros balaenopterídeos e não expõem a nadadeira caudal ao mergulhar. Podem dar saltos, deslocar-se rapidamente com saltos curtos semelhantes aos dos golfinhos e realizar comportamento de periscópio para verificar o entorno; também podem demonstrar curiosidade por embarcações, aparecendo eventualmente de modo inesperado (RICE, 1998; LODI & BOROBIA, 2013). Podem segregar-se em grupos por idade, sexo e estado reprodutivo durante a migração (RICE, 1998).



Figura I.2.6-1: Baleia-minke-antártica (*Balaenoptera bonaerensis*) observada durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Os registros da baleia-minke-antártica na Bacia de Santos foram raros, ocorrendo uma vez durante o primeiro ano, um indivíduo

solitário, três vezes durante o segundo ano, em grupos que variaram de 2 a 4 indivíduos e duas vezes no terceiro ano, um indivíduo solitário e um grupo formado por dois animais. A presença de filhote foi registrada no segundo e no terceiro anos. Dos seis registros, três ocorreram no talude, um na plataforma continental e dois na região oceânica (Figura I.2.6-2).

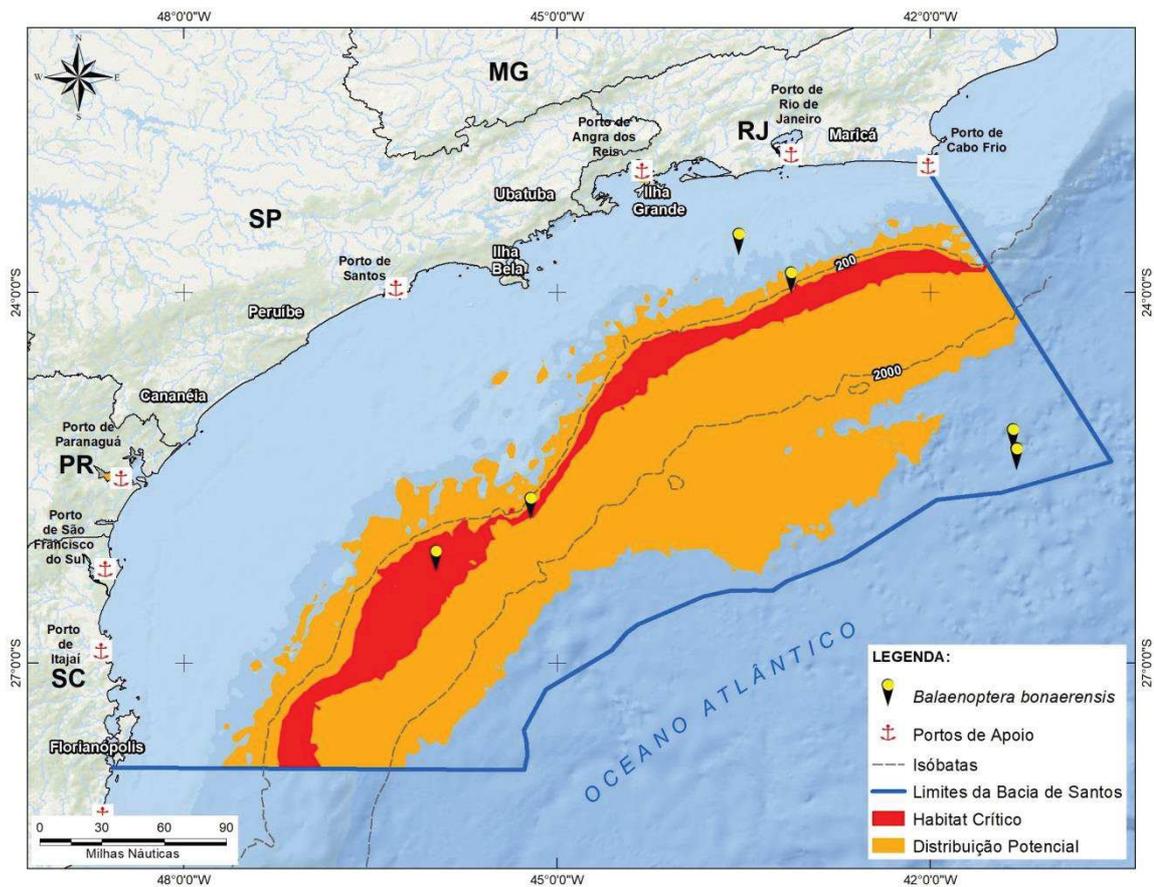


Figura I.2.6-2: Localização dos registros de *Balaenoptera bonaerensis* durante o PMC-BS.

I.2.7 Baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*)

Quadro I.2.7-1: Descrição da baleia-jubarte, *Megaptera novaeangliae*.

Subordem Mysticeti	Família Balaenopteridae
Baleia-jubarte, <i>Megaptera novaeangliae</i> Borowski, 1781	
Tamanho adulto: 11 a 17 metros	Peso adulto: até 40.000 kg
Tamanho filhote: até 4,6 metros	Peso filhote: ~ 680 kg
Distribuição: Global, com migração anual entre águas tropicais e regiões produtivas circumpolares de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: nadadeiras peitorais extremamente longas, que chegam a medir 1/3 do comprimento do corpo; nadadeira dorsal pequena localizada a 2/3 da extremidade do rostro, variando em forma, de achatada a falcada; nadadeira caudal serrilhada ao longo da borda posterior, com um entalhe profundo, e a face ventral variando de toda branca a toda preta com diversos padrões intermediários; cabeça e mandíbula com numerosos tubérculos.	
Comportamento: geralmente solitárias, mas podem formar pequenos grupos instáveis de até três indivíduos e grupos maiores nas áreas de alimentação e reprodução; nas áreas de reprodução, os maiores grupos são os competitivos, onde machos disputam acesso a uma fêmea nuclear, com comportamento ativo na superfície, exalação de ruídos e formação de bolhas; realizam frequentemente comportamentos aéreos, como os saltos, as batidas de nadadeira caudal e peitoral; frequentemente expõem a cauda depois de arquear o dorso e antes de realizar um mergulho.	
Uso de habitat: nas regiões tropicais de reprodução, ocorrem primariamente em águas da plataforma continental, preferindo áreas rasas ao redor de ilhas e recifes de corais. Na migração, podem atravessar regiões oceânicas profundas.	
Tamanho de grupo: 1-3 baleias, podendo chegar a mais de 20 baleias	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Quase ameaçada

Características. A baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) é a quarta maior espécie da família Balaenopteridae, atingindo 17 metros de comprimento. As fêmeas são geralmente de 1 a 1,5 metros maiores que os machos. O dorso é preto, e a região ventral apresenta uma coloração com padrões variáveis entre toda branca e toda preta. A principal característica da espécie é o tamanho das nadadeiras peitorais que chegam a medir um terço do comprimento do corpo, e

apresentam uma coloração branca na face ventral, variando de toda branca para toda preta na face dorsal, dependendo da população. A nadadeira dorsal é pequena e localizada a dois terços da extremidade do rostro, e é altamente variável em forma, de achatada a falcada (mas menor que dos outros balaenopterídeos). A caudal é serrilhada ao longo da borda posterior e apresenta um entalhe profundo. Enquanto a face dorsal da nadadeira caudal é preta, a face ventral também varia de toda branca a toda preta, sendo os padrões de branco e preto distintos, e usados para identificação dos indivíduos (KATONA & WHITEHEAD, 1981). Outra característica diagnóstica da espécie é a presença de numerosos tubérculos na cabeça e na mandíbula (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. Com diversas características distintivas, a baleia-jubarte pode ser facilmente identificada. A distância pode ser confundida com a baleia-franca austral (*Eubalaena australis*), de coloração semelhante, ou eventualmente outras espécies da família Balaenopteridae. Contudo, após um olhar mais cuidadoso e a curta distância, as características morfológicas e comportamentais da baleia-jubarte claramente se apresentam.

Distribuição. A espécie é cosmopolita, encontrada em todos os oceanos do mundo (exceto no Oceano Ártico). As baleias-jubartes realizam migrações sazonais de longa distância entre as áreas de alimentação nas altas latitudes, onde se alimentam durante o verão, e as áreas de reprodução nas baixas latitudes, onde acasalam e têm seus filhotes durante os meses de inverno (DAWBIN, 1966). Segundo a Comissão Internacional da Baleia (IWC), existem sete subpopulações (ou estoques) de baleias-jubarte em áreas de reprodução no Hemisfério Sul. A população de baleias-jubarte que reproduzem no Brasil pertence ao estoque reprodutivo “A”. No Brasil, as baleias-jubarte ocorrem principalmente no inverno e primavera entre 5° a 23°S (ZERBINI et al., 2004b; ANDRIOLO et al., 2010b), concentrando-se no Banco dos Abrolhos, no sul da Bahia e norte do Espírito Santo, a principal área de reprodução (MARTINS et al., 2001; FREITAS et al., 2004; ANDRIOLO et al., 2010b). Além da região de concentração no Banco dos Abrolhos, avistagens da espécie são reportadas também em ilhas oceânicas, como o Arquipélago de Fernando de Noronha (LODI, 1994) e Trindade (WEDEKIN et al., 2014), na costa sul (até ~ 32°S) (LODI &

BOROBIA, 2013), Nordeste (MAGALHÃES et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009) e ocasionalmente na região Norte (PRETTO et al., 2009). As baleias-jubarte que frequentam o Brasil migram para as áreas de alimentação em torno das ilhas Geórgia do Sul e Sanduíche do Sul, no Mar da Escócia (STEVICK et al., 2006; ZERBINI et al., 2006; ENGEL et al., 2008; ENGEL & MARTIN, 2009; CYPRIANO-SOUZA et al., 2010).

População. A estimativa mais recente de abundância para as baleias que reproduzem em águas brasileiras foi de aproximadamente 12.000 indivíduos (PAVANATO et al., 2017). Atualmente, a população vem se recuperando (WARD et al., 2011), com taxa de crescimento estimada em 12% por ano (WEDEKIN et al., 2017).

Comportamento. Comportamentos acrobáticos como os saltos, as batidas de nadadeira peitoral e caudal são característicos da espécie. As baleias-jubarte não vivem em grupos estáveis e o sistema social dessa espécie nas áreas de alimentação é caracterizado por grupos de até 20 indivíduos e associações efêmeras relacionadas com a distribuição das presas. São as únicas baleias que realizam uma técnica de alimentação cooperativa, na qual formam uma rede de bolhas para encurralar o cardume de peixes (JEFFERSON et al., 2015). Nas áreas de reprodução, os grupos competitivos são compostos por mais de dois machos competindo pelo acesso à fêmea (animal nuclear) (CLAPHAM, 1994). Nessas áreas, também são frequentes indivíduos solitários, em dupla, e pares de fêmea com filhote (MARTINS et al., 2001).

Outra característica importante da espécie está em seu complexo comportamento acústico (ROSSI-SANTOS, 2017). Os machos, durante a temporada reprodutiva, produzem longos e variantes sons que se organizam em uma estrutura sequencial e recebem o nome de canto (PAYNE & MAC VAY, 1971). Esses cantos seguem se modificando ao longo do tempo e são característicos de cada população (DARLING et al., 2006).



Figura I.2.7-1: Baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) observadas na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. A baleia-jubarte foi o mysticeto mais avistado na Bacia de Santos, com 41 registros no primeiro ano, 42 no segundo e 48 no terceiro, totalizando 131 registros. Foram registrados indivíduos solitários até grupos de 50 indivíduos, em algumas ocasiões com filhotes. Os registros se concentraram entre os meses de maio e outubro dos respectivos anos. Uma grande parcela dos indivíduos era de animais jovens. Houve registro em ambiente costeiro, na plataforma continental, talude e região oceânica, porém a maioria se concentrou em áreas da plataforma continental e transição com o talude, mais especificamente nas proximidades do Estado do Rio de Janeiro (**Figura I.2.7-2**). Os meses de maio e outubro dos respectivos anos tiveram mais registros; e a maior parte dos animais era jovem.

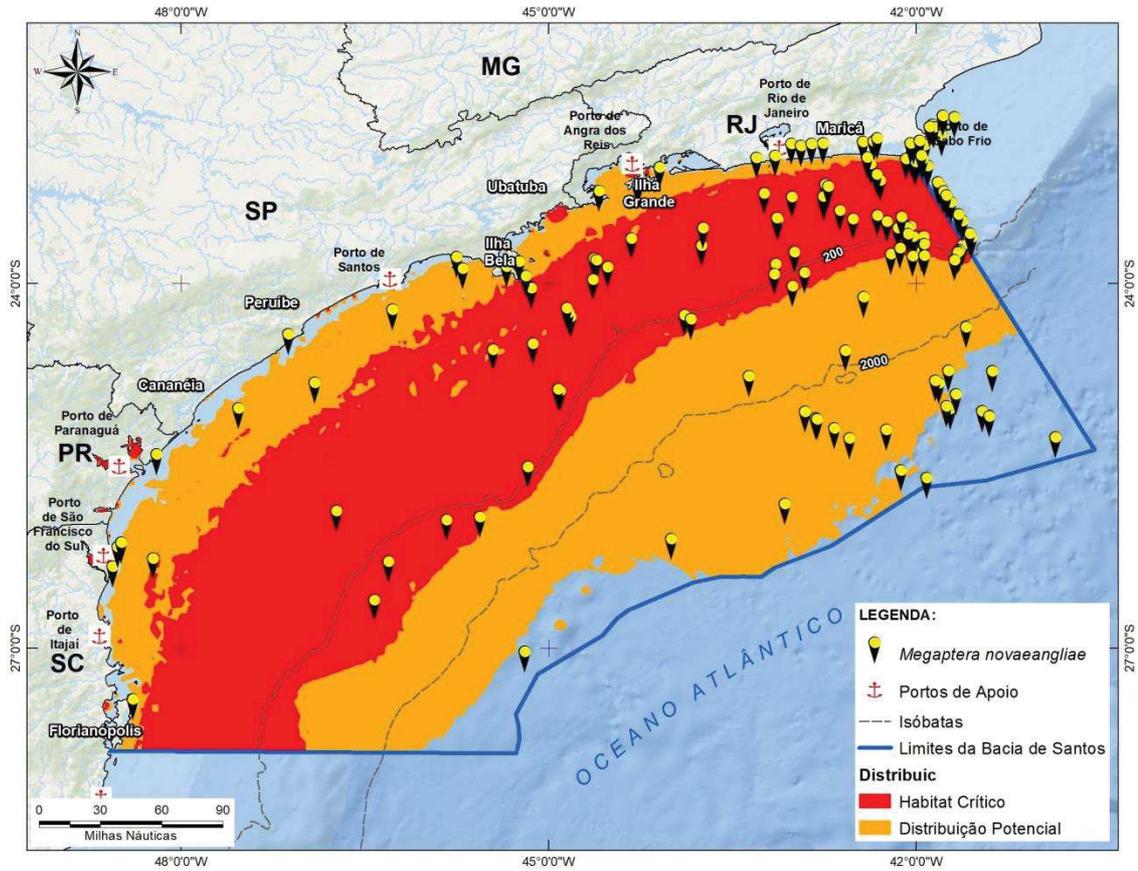


Figura I.2.7-2: Localização dos registros de *Megaptera novaeangliae* durante o PMC-BS.

II. ODONTOCETI

II.1 Família Physeteridae

A família Physeteridae já incluiu até 20 gêneros durante os períodos Plioceno e Mioceno (entre cerca de 2 a 24 milhões de anos atrás). Desde então, reduziu-se a um único gênero (*Physeter*), com uma espécie, o cachalote *Physeter macrocephalus* (REEVES et al., 2002). O cachalote é conhecido por ser o maior representante dentre os odontocetos e ter o maior dimorfismo sexual do grupo, com machos bem maiores que as fêmeas. Também são conhecidos por realizarem mergulhos profundos e possuírem diversas adaptações para esses mergulhos, incluindo o órgão espermacete.

II.1.1 Cachalote (*Physeter macrocephalus*)

Quadro II.1.1-1: Descrição da cachalote, *Physeter macrocephalus*.

Subordem Odontoceti	Família Physeteridae Linnaeus, 1758
Cachalote, <i>Physeter macrocephalus</i>	
Tamanho adulto: até 12 metros (fêmeas) e 18 metros (machos)	Peso adulto: até 16.000 kg (fêmeas) e 57.000 kg (machos)
Tamanho filhote: até 4,5 metros	Peso filhote: ~1.000 kg
Distribuição: Águas tropicais, temperadas a circumpolares de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: cabeça grande e quadrangular (cerca de 1/3 a 1/4 do tamanho total do corpo); coloração cinza-escura uniforme com áreas brancas ao redor da boca; superfície do corpo enrugada atrás da cabeça e no flanco; nadadeira peitoral relativamente pequena e espatulada; nadadeira dorsal baixa, pequena e arredondada; nadadeira caudal triangular com a borda lisa (pode ter entalhes), protuberâncias no dorso entre a nadadeira dorsal e caudal; mandíbula estreita e bem menor que o maxilar, orifício respiratório elevado na ponta da cabeça à esquerda do eixo central devido à assimetria cranial, o que faz o borriço ser caracteristicamente projetado para frente e para esquerda.	
Comportamento: apresentam dois estados comportamentais: forrageio e descanso/socialização; durante o forrageio, fazem mergulhos profundos que podem durar mais de uma hora (média de 40 minutos) e, entre os mergulhos, submergem para respirar por cerca de 10 minutos; realizam arqueamento do dorso e exposição caudal ao dar início a um mergulho profundo; quando na superfície, expõem apenas parte da cabeça, dorso e a nadadeira dorsal; quando em descanso/socialização, podem permanecer por horas na superfície e realizar saltos e comportamentos sociais.	
Uso de habitat: talude continental e áreas oceânicas.	
Tamanho de grupo: as fêmeas e imaturos são encontrados em grupos de 10 - 50 indivíduos em áreas tropicais e subtropicais. Os machos são geralmente solitários e se alimentam em águas temperadas e circumpolares.	
Status IUCN (2018): Vulnerável	Status MMA (2014): Vulnerável

Características. O cachalote (*Physeter macrocephalus*) é a maior espécie de odontoceto existente. O dimorfismo sexual é bem acentuado: machos de comprimento total de até 18 metros e fêmeas bem menores, de 9 a 12 metros (RICE, 1989). O corpo é robusto e apresenta uma coloração amarronzada escura

uniforme. A cabeça é grande e quadrangular, onde se encontra o complexo nasal responsável pela produção das vocalizações (cliques). O complexo nasal é constituído principalmente pelo órgão espermacete, que é preenchido com um óleo que foi muito utilizado durante a exploração baleeira (RICE, 1989; CRANFORD et al., 1996). Além de seu grande tamanho, o cachalote é caracterizado pela nadadeira dorsal pequena e arredondada, situada na parte mais posterior do dorso. O orifício respiratório encontra-se na ponta da cabeça, na forma de uma protuberância em forma de “S”, à esquerda do eixo central. O borrifo é frontal e à esquerda, em ângulo baixo. A nadadeira caudal é lisa, mas pode apresentar cortes que são utilizados para foto-identificação (RICE, 1989; LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. É uma espécie fácil de ser identificada, embora fique pouco exposta na superfície. Quando distante, pode ser confundida com outras baleias grandes, como a baleia-jubarte. No entanto, são bem distintas morfologicamente e a direção do borrifo, no cachalote, é bem característica.

Distribuição. A espécie é cosmopolita, de distribuição abrangente. As fêmeas e imaturos vivem em grupos em águas tropicais e subtropicais, enquanto os machos se deslocam gradualmente para as regiões temperadas e circumpolares de todos os oceanos, permanecendo mais solitários, mas retornam para as águas tropicais para reprodução (WHITEHEAD & WEILGART, 2000). A ocorrência da espécie no Brasil é comum, porém pouco se conhece sobre a distribuição, movimentação e estrutura populacional. A maior parte dos registros provém de encalhes. A espécie é encontrada em áreas de 1.000 a 3.000 metros, presumivelmente em áreas de maior produtividade. Os animais são encontrados em áreas mais próximo da costa apenas onde a plataforma é mais estreita. Os registros de encalhes são mais comuns no Nordeste do Brasil. Há um registro de encalhe em massa (33 indivíduos) em 1972 no Rio Grande do Sul (LODI & BOROBIA, 2013).

População. Os cachalotes estão incluídos nos registros de caça da indústria baleeira no Brasil, tanto na estação de Costinha na Paraíba como em Cabo Frio (TOLEDO & LANGGUTH, 2009). Na Paraíba, tanto machos quanto fêmeas foram capturados, inclusive fêmeas prenhes e lactantes. O pico de captura dos machos

foi nos meses de julho e agosto. A captura simultânea de fêmeas não prenhes, prenhes e lactantes sugere o nascimento de filhotes durante todo o ano, já que a gestação dura cerca de 15 meses. Embora tenha sido uma das espécies mais exploradas pela caça, suas populações globais ainda são relativamente abundantes. Uma análise quantitativa global de tendência populacional sugere uma redução de 67% da população original até 1990 (WHITEHEAD, 2002). Atualmente, a tendência populacional é desconhecida.

Comportamento. As fêmeas tendem a formar unidades sociais estáveis de 10 - 12 indivíduos, mas também formam grupos de até 50 indivíduos. Já os machos, em geral, permanecem solitários, associando-se por curtos períodos aos grupos de fêmeas. A exposição caudal é feita durante mergulhos longos e profundos para forrageio (em média 40 minutos, mas podem durar mais de duas horas). Os intervalos na superfície entre os mergulhos duram em média 10 minutos (PAPASTAVROU et al., 1989). Juvenis, ou fêmeas na presença de machos, realizam saltos acrobáticos expondo quase totalmente o corpo para fora da água. Registros de indivíduos caçados no Nordeste do Brasil apresentaram vestígios de alimento no estômago (TOLEDO & LANGGUTH, 2009), em especial lulas da família Histoteuthidae (GURJÃO et al., 2003).

O som do cachalote consiste em cliques com frequência de pico centrada em cerca de 15 kHz, com intervalo de aproximadamente 0.5 - 2.0 s e emitidos quase que continuamente durante o forrageio. Esses cliques são chamados de clicks “usuais” e são utilizados para ecolocalização. As fêmeas e imaturos produzem cliques estereotipados denominados “codas”, que são utilizados para comunicação e compartilhados entre os clãs vocais (RENDELL & WHITEHEAD, 2003). Os machos produzem “clicks lentos” que apresentam frequência mais baixa (~ 4 kHz) e intervalos de até 7 s (JAQUET et al., 2001).



Figura II.1.1-1: Cachalotes (*Physeter macrocephalus*) registrados durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Foram 21 registros visuais de cachalote durante os três primeiros anos do PMC-BS, normalmente variando de indivíduos solitários até grupos com seis indivíduos. A exceção foi um grupo de 55 indivíduos registrado na 4ª Campanha de Telemetria, este grupo foi o único que teve a presença de filhotes. Um total de 26 registros foram feitos acusticamente durante o Monitoramento Acústico Passivo (MAP) rebocado. Este número maior de detecções acústicas se deve ao comportamento de forrageio do cachalote, que durante seus longos mergulhos permanece indisponível para os registros visuais, porém produz uma série de cliques que podem ser detectados pelo MAP (Monitoramento Acústico Passivo) a vários quilômetros de distância. Sua distribuição ocorreu entre o talude continental e a região oceânica, sendo que 29 registros foram efetuados no talude e 18 na região oceânica (**Figura II.1.1-2**).

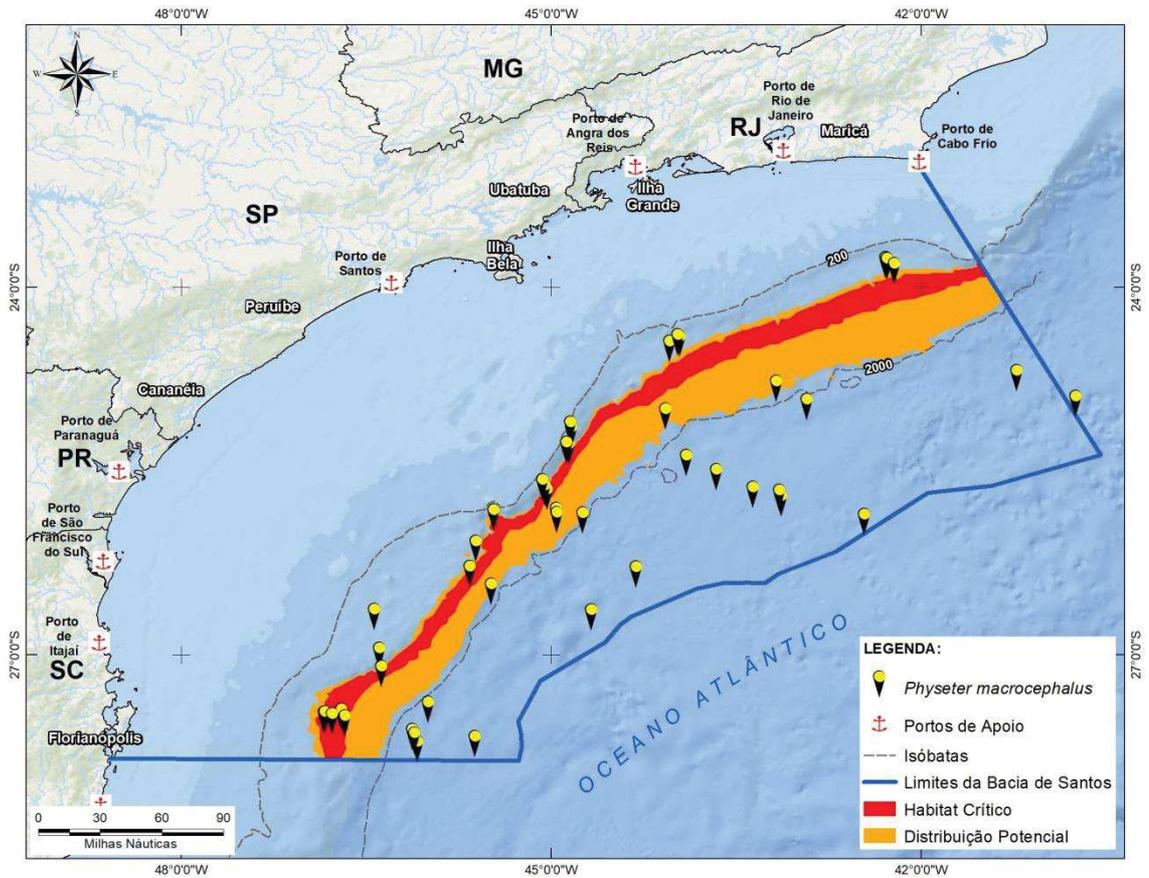


Figura II.1.1-2: Localização dos registros de *Physeter macrocephalus* durante o PMC-BS.

II.2 Família Kogiidae

A família Kogiidae é representada por duas espécies: o cachalote-pigmeu (*Kogia breviceps*) e o cachalote-anão (*Kogia sima*). Foram reconhecidas como duas espécies apenas em 1966, pois até então eram consideradas uma espécie única (*Kogia breviceps*). Inicialmente, estavam inseridas na família Physeteridae, representada hoje apenas pelo cachalote (*Physeter macrocephalus*). Ainda assim, dividem características morfológicas com esta espécie, como a assimetria craniana, ainda mais acentuada em Kogiidae, e o órgão espermacete, responsável pela produção dos cliques de ecolocalização. A mandíbula é pequena e posicionada para baixo. O rostro é um dos mais curtos entre os cetáceos. A coloração no dorso é escura, entre o preto e o azul acinzentado, que vai gradualmente se tornando mais clara nos flancos. A região ventral é de cor clara. Os dentes são pontiagudos e presentes apenas na mandíbula. Apresenta uma linha curva de coloração branca entre os olhos e as nadadeiras peitorais, que lembram guelras (falsas guelras) (SHIRIHAI & JARRET, 2006; BLOODWORTH & ODELL, 2008). O corpo robusto, combinado a essas características, dão um aspecto de tubarão aos membros da família. A alimentação é baseada principalmente em cefalópodes, mas peixes e crustáceos também fazem parte da dieta. A distribuição é cosmopolita, em águas tropicais e temperadas, com preferência por águas oceânicas e do talude continental. Como a distribuição e as características das espécies são semelhantes, é muito difícil confirmar a identificação durante uma avistagem. São raramente observadas no mar devido ao comportamento críptico. Não se aproximam de embarcações e nadam em grupos pequenos. Muito do que se conhece da espécie provém de animais encalhados na praia (SHIRIHAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIA, 2013; MOURA et al., 2016).

Durante o PMC-BC, foram realizados registros acústicos de cliques de kogídeos e um único registro visual, mas sem identificação de espécie.

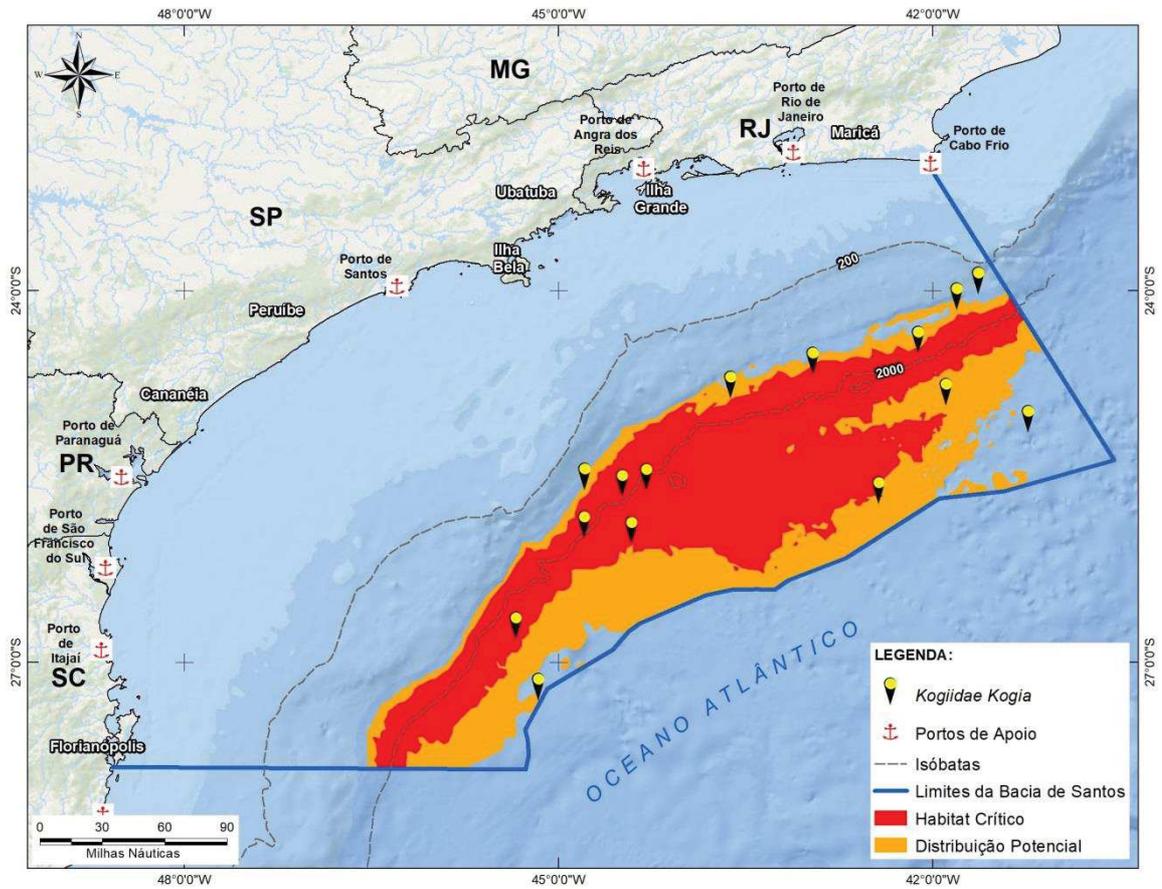


Figura II.2-1: Localização dos registros de *Kogia* sp. durante o PMC-BS.

II.2.1 Cachalote-pigmeu (*Kogia breviceps*)

Quadro II.2.1-1: Descrição da cachalote-pigmeu, *Kogia breviceps*.

Subordem Odontoceti	Família Kogiidae
Cachalote-pigmeu, <i>Kogia breviceps</i> Blainvillei, 1838	
Tamanho adulto: até 3,8 metros	Peso adulto: até 450 kg
Tamanho filhote: 1,2 metros	Peso filhote: 50 kg
Distribuição: Águas tropicais e temperadas de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: corpo compacto e robusto, cabeça quadrada, rosto extremamente curto e boca pequena posicionada ventralmente; a coloração no dorso é escura, entre o preto e o azul acinzentado, que vai gradualmente se tornando mais claro até a região ventral, cuja coloração é clara; uma mancha mais escura circunda a região dos olhos e se destaca uma linha curva de coloração branca entre os olhos e as nadadeiras peitorais que lembram guelras (falsas guelras); a nadadeira dorsal é pequena e falcada, afastada do centro do corpo; o corpo robusto, a boca ventral e as falsas guelras dão a aparência de um tubarão, o que é peculiar entre os cetáceos.	
Comportamento: comportamento críptico e movimentos lentos na superfície. Podem permanecer boiados e ocasionalmente saltar.	
Uso de habitat: talude e águas oceânicas, além da plataforma continental.	
Tamanho de grupo: geralmente sozinhos ou em grupos de até 7 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O cachalote-pigmeu apresenta corpo robusto e compacto e o dorso escuro. A coloração se torna gradualmente mais clara em direção ao ventre. A cabeça é quadrada (mais pontiaguda entre os jovens), o rosto é quase ausente e a boca pequena é posicionada para baixo. Além do aspecto peculiar, possui uma mancha branca em forma curvada entre os olhos e as nadadeiras peitorais, chamadas de falsas guelras (SHIRIHAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. Muito semelhante ao cachalote-anão (*Kogia sima*), o que torna difícil a separação das duas espécies em campo. O cachalote-pigmeu é um pouco maior, apresenta uma nadadeira dorsal mais arredondada e posicionada

mais posteriormente no corpo. O cachalote-pigmeu também possui uma corcova característica quando emerge para respirar, enquanto o dorso do cachalote-anão tem uma aparência retilínea quando na superfície.

Distribuição. A espécie habita todos os oceanos tropicais e temperados do mundo. Muito do que se conhece da espécie provém do registro de animais encalhados nas praias, que podem ser frequentes em algumas localidades. Parece preferir águas mais temperadas que o cachalote-anão, além da quebra da plataforma continental (SHIRIHAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIA, 2013). No Brasil, a análise dos registros de encalhes de *Kogia* mostrou que eles são relativamente frequentes. Ambas as espécies de *Kogia* foram registradas ao longo de quase toda a costa brasileira, com exceção do extremo norte. Os encalhes do cachalote-pigmeu foram mais frequentes na porção sul quando comparada à porção norte, e vice-versa para o cachalote-anão. O estudo confirma a preferência do cachalote-pigmeu por águas mais temperadas e produtivas que o cachalote-anão, cujos encalhes foram mais comuns em águas tropicais do Nordeste do Brasil (MOURA et al., 2016).

População. Não há estimativas de abundância globais para a espécie, em parte devido à dificuldade de avistagem decorrente de seu comportamento inconspícuo. Contudo, o número de encalhes em algumas regiões sugere que a espécie não seja rara (IUCN, 2018).

Comportamento. Raramente é observado devido a seu comportamento críptico e hábito oceânico. O comportamento na superfície é lento. Quando emergem na superfície para respirar, o dorso arqueia formando uma corcova. Não expõem a nadadeira caudal ao mergulhar. Podem ser vistos descansando na superfície e ocasionalmente saltar. Raramente aproximam-se de embarcações. Os animais são solitários ou formam grupos de até sete indivíduos. Alimentam-se principalmente de cefalópodes, mas peixes e crustáceos podem fazer parte da dieta. Acredita-se que se alimentem próximo do fundo (SHIRIHAI & JARRET, 2006; BLOODWORTH & ODELL, 2008; LODI & BOROBIA, 2013).

Registros no PMC-BS. Foi avistado um único indivíduo de *Kogia* sp. na região do talude (~1.600 m de profundidade) da Bacia de Santos. No entanto, durante o monitoramento acústico passivo, as detecções acústicas indicam que o gênero

Kogia não é tão raro. Foram 14 registros de cliques de ecolocalização atribuídos ao gênero (cliques com pico em 125-130 kHz). As detecções por método acústico passivo se deram no talude continental e na região oceânica (**Figura II.2.1-1**).

II.2.2 Cachalote-anão (*Kogia sima*)

Quadro II.2.2-1: Descrição da cachalote-anão, *Kogia sima*.

Subordem Odontoceti	Família Kogiidae
Cachalote-pigmeu, <i>Kogia sima</i> Owen, 1866	
Tamanho adulto: até 2,8 metros	Peso adulto: até 275 kg
Tamanho filhote: 1,0 metro	Peso filhote: 40 kg
Distribuição: Águas tropicais e temperadas de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: corpo compacto e robusto, cabeça quadrada, porém com aspecto mais pontiagudo que o cachalote-pigmeu; rostro extremamente curto e boca pequena, posicionada ventralmente; a coloração no dorso é escura, entre o preto e o azul acinzentado, que vai gradualmente se tornando mais clara até a região ventral; mancha mais escura circunda a região dos olhos e se destaca uma linha curva de coloração branca entre os olhos e nadadeiras peitorais que lembram guelras (falsas guelras); a nadadeira dorsal é alta e localizada mais no centro do corpo, quando comparado ao cachalote-pigmeu; o corpo robusto e as falsas guelras dão a aparência de um tubarão, apesar da cabeça mais pontiaguda e o corpo mais afilado a partir da nadadeira dorsal.	
Comportamento: comportamento críptico e movimentos lentos na superfície. Podem permanecer boiados e raramente saltam.	
Uso de habitat: talude e plataforma continental.	
Tamanho de grupo: animais solitários ou grupos de até 10 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O corpo é robusto e compacto, o dorso escuro e a coloração gradualmente mais clara até o ventre. A cabeça é quadrada, porém mais pontiaguda (aspecto mais cônico), quando comparado ao cachalote-pigmeu. O rostro é quase ausente e a boca pequena é posicionada para baixo. Possui uma mancha branca em forma curvada entre os olhos e as nadadeiras peitorais, chamada de falsa guelra. De maneira geral, a espécie é muito semelhante ao cachalote-pigmeu, mas é um pouco menor e tem a nadadeira dorsal mais centrada no corpo.

Espécies similares. Muito semelhante ao cachalote-pigmeu (*Kogia breviceps*), o que o torna de difícil identificação no campo. O cachalote-pigmeu é um pouco maior, apresenta uma nadadeira dorsal mais arredondada e posicionada mais posteriormente no corpo. O dorso do cachalote-anão tem uma forma retilínea quando emerge na superfície, enquanto o dorso do cachalote-pigmeu tem uma corcova característica.

Distribuição. A espécie habita todos os oceanos tropicais e temperados do mundo. Parece ter preferência por águas mais quentes e rasas que o cachalote-pigmeu, sendo encontrado em áreas do talude e plataforma continental (SHIRIAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIÁ, 2013). A análise dos encalhes de *Kogia* no Brasil mostrou que eles são relativamente frequentes. Ambas as espécies de *Kogia* foram registradas ao longo de quase toda a costa brasileira, com exceção do extremo norte. Os encalhes do cachalote-anão foram mais frequentes no litoral da região Norte, quando comparada ao litoral da região Sul, com uma tendência contrária para o cachalote-pigmeu. O estudo sugere também que há uma preferência do cachalote-anão por águas mais tropicais que o cachalote-pigmeu, para o qual os encalhes foram mais comuns em águas mais temperadas e produtivas do Sul do Brasil (MOURA et al., 2016).

População. Não há estimativas de abundância globais para a espécie, em parte devido à dificuldade de avistagem decorrente de seu comportamento inconspícuo. Contudo, o número de encalhes em algumas regiões sugere que a espécie não seja rara (IUCN, 2018).

Comportamento. Raramente é observado devido a seu comportamento críptico. Muito do que se conhece da espécie provém da análise de animais encalhados, que pode ser frequente em algumas regiões. Ao emergir na superfície apresentam geralmente movimentos lentos, expõem pouco o dorso e não expõem a nadadeira caudal ao mergulhar. Podem ser vistos descansando na superfície e raramente dão saltos. Geralmente não se aproximam de embarcações. Formam grupos de até 10 indivíduos, mas também podem ser observados solitariamente. Alimentam-se principalmente de cefalópodes, mas peixes e crustáceos podem fazer parte da dieta. Acredita-se que se alimentem no fundo (SHIRIAI & JARRET, 2006; LODI & BOROBIÁ, 2013).

Registros no PMC-BS. Foi avistado um único indivíduo de *Kogia* sp. na região do talude (~1.600 m de profundidade) da Bacia de Santos. No entanto, durante o monitoramento acústico passivo, as detecções acústicas indicam que o gênero *Kogia* não é tão raro. Foram 14 registros de cliques de ecolocalização atribuídos ao gênero (cliques com pico em 125-130 kHz). As detecções por método acústico passivo se deram sempre em regiões de transição entre o talude e a região oceânica, em áreas com profundidade de 1.400 m a 2.650 m (**Figura II.2.1-1**).

II.3 Família Ziphiidae

A família Ziphiidae compreende as baleias-bicudas, que formam um grupo relativamente grande de cetáceos, com 22 espécies e seis gêneros. Apesar de grande, é um grupo pouco conhecido, com espécies de hábitos oceânicos e que mergulham a grandes profundidades para se alimentar de lulas. As espécies apresentam tamanho médio, variando de 3,7 a 9,8 m. O rostro é pronunciado nos adultos e mais curto nos animais jovens. O orifício respiratório é em forma de meia-lua. Cabeça e nadadeira dorsal de pequeno tamanho, com a nadadeira posicionada no terço posterior do corpo. As nadadeiras peitorais se encaixam em pequenas depressões do corpo, como se fossem bolsões. Uma característica marcante é que possuem de um a dois pares de dentes na mandíbula, que eclodem apenas nos machos adultos, à exceção do gênero *Berardius*, cujas fêmeas também possuem.

Durante o PMC-BS foram realizados somente registros acústicos de cliques de zifídeos, mas sem identificação de gênero ou espécie (**Figura II.3-1**).

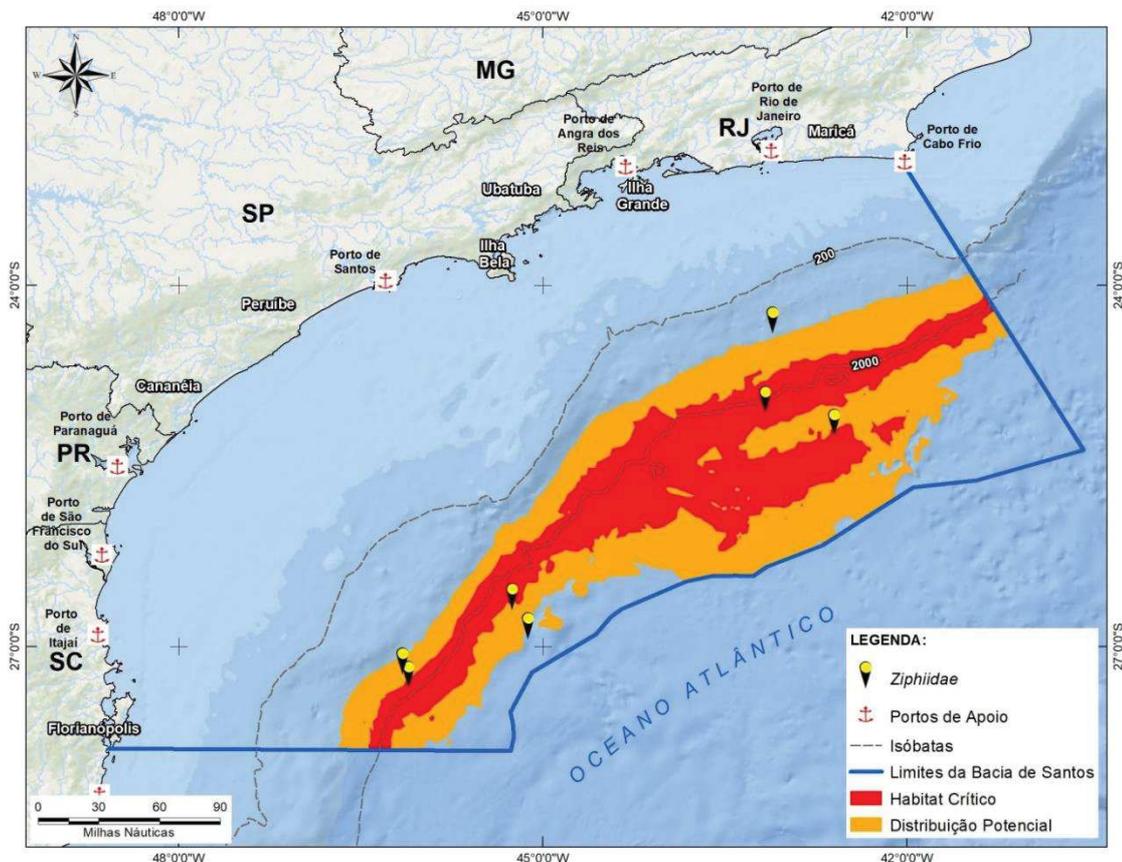


Figura II.3-1: Localização dos registros acústicos da Família Ziphiidae durante o PMC-BS.

II.4 Família Delphinidae

A Família Delphinidae é a família de odontocetos mais diversificada, com 36 espécies conhecidas. Consequentemente, os delfínídeos apresentam uma diversidade de formas e variações ecológicas que levam à ausência de consensos quanto às suas relações filogenéticas. Não é incomum casos de híbridos, incluindo alguns férteis. A diversidade de morfotipos se manifesta nas variações de tamanho, coloração, morfologia externa e histórias de vida. Algumas espécies apresentam rostro longo e bem característico, enquanto outras apresentam rostro curto ou não visíveis. O número de dentes varia consideravelmente (14 a 200), refletindo uma diversidade de hábitos alimentares, com espécies generalistas até aquelas especialistas em cefalópodes. As menores espécies, tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) e golfinho-de-commersoni (*Cephalorhynchus commersonii*), não passam de 1,5 metros, enquanto uma orca adulta (*Orcinus orca*) pode chegar a 9,8 metros. Em geral, apresentam distribuição ampla e cosmopolita em todos os oceanos do mundo e em algumas bacias hidrográficas. Porém, algumas espécies são restritas a algumas regiões, como o golfinho-pintado-do-atlântico (*Stenella frontalis*) e o golfinho-de-Clymene (*Stenella clymene*), que ocorrem em águas tropicais e subtropicais. O tucuxi é o único representante de água doce. A organização social é complexa, formando grupos de tamanhos diversos em sistemas sociais do tipo fissão-fusão, ou com unidades matrilineares estáveis, como no caso das orcas. Os delfínídeos apresentam uma grande plasticidade acústica e adaptam suas emissões sonoras de acordo com as circunstâncias. No Brasil, ao menos 21 espécies apresentam registros confirmados.

II.4.1 Orca (*Orcinus orca*)

Quadro II.4.1-1: Descrição da orca, *Orcinus orca*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Orca, <i>Orcinus orca</i> Linnaeus, 1758	
Tamanho adulto: 6,5 a 9,8 metros	Peso adulto: até 10.000 kg
Tamanho filhote: 2,1 a 2,6 metros	Peso filhote: 160 a 180 kg
Distribuição: Cosmopolita, sendo encontrada em todos os oceanos e na maioria dos mares, tanto tropicais quanto temperados	
Caracteres diagnósticos: padrão de cor preto e branco único, com a face ventral (da maxila para a região urogenital) branca, lobos brancos estendendo para cima e para trás nos flancos inferiores, e o dorso preto (exceto a mancha cinza clara atrás da dorsal – “sela”) com uma mancha branca atrás de cada olho, de forma e de tamanho variável dependendo da população; nadadeira dorsal alta, ereta e triangular nos machos (2 metros), e falcada e afilada na ponta nas fêmeas e juvenis (0,9 metros); nadadeiras peitorais grandes e arredondadas.	
Comportamento: animais sociais, formando grupos geralmente entre 2 e 20 indivíduos ou mais; algumas vezes, quando fazem mergulhos profundos, expõem a nadadeira caudal; podem ser mais ativos, com saltos, periscópio (exposição da cabeça verticalmente acima da água), batidas de nadadeira caudal e peitoral; e podem mostrar grande interesse por barcos.	
Uso de habitat: desde estuários e regiões costeiras até águas profundas, ocorrem em maior abundância em águas de grande produtividade biológica.	
Tamanho de grupo: 2-25 indivíduos, podendo chegar a 50 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Deficiente em dados	Status MMA (2014): Deficiente em dados

Características. A orca (*Orcinus orca*) é a maior espécie da família Delphinidae. Os machos atingem entre 7,5 e 9 metros quando adultos, e as fêmeas de 6,5 a 8 metros. Orcas são facilmente identificáveis em campo. Apresentam um padrão de cor preto e branco único, com a face ventral branca (da maxila para a região urogenital), e o dorso preto com lobos brancos estendendo para cima, a partir dos flancos inferiores. Possuem uma mancha branca atrás de cada olho, a “mancha ocular”, que pode variar em forma e

tamanho dependendo do ecótipo. Uma mancha cinza clara atrás da nadadeira dorsal (“sela”) também é comum em algumas populações (JEFFERSON et al., 2015). A nadadeira dorsal é outra característica distintiva. Nos machos é alta, ereta e triangular, atingindo até 2 metros de altura. Nas fêmeas e juvenis, a nadadeira dorsal é falcada e afilada, ou levemente arredondada nas pontas, atingindo até 90 centímetros de altura. As nadadeiras peitorais são grandes e arredondadas e a nadadeira caudal é larga, com a borda posterior reta ou ligeiramente convexa (JEFFERSON et al., 2015).

Embora uma única espécie de orca é atualmente reconhecida, dados morfológicos, genéticos e ecológicos sugerem a existência de pelo menos oito formas distintas de orcas (ecótipos). No Oceano Atlântico Norte, existem pelo menos dois ecótipos, enquanto na Antártica, são reconhecidas até seis formas/tipos, descritas com base na coloração, morfologia e aparente especialização no tipo de dieta.

Espécies similares. A orca é facilmente reconhecida em campo devido ao seu tamanho e coloração. Pode ser confundida a longas distâncias com outros delfínidos grandes, como a falsa-orca (*Pseudorca crassidens*) ou golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*).

Distribuição. Cosmopolita, a orca distribui-se por todos os mares do globo, desde águas frias, perto do gelo, até regiões tropicais. Ocorre tanto em águas rasas e próximo da costa até regiões oceânicas. Ao longo da costa brasileira, as orcas têm sido registradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste (LODI & HETZEL, 1998; DALLA-ROSA et al., 2002; DALLA-ROSA & SECCHI, 2007; SANTOS & SILVA, 2009; WEDEKIN et al., 2014), com registros ocasionais até o Nordeste (LODI & BOROBIA, 2013).

População. É estimado um número mínimo de 50.000 orcas em todo o mundo (FORNEY & WADE, 2006). Mas a abundância varia entre diferentes regiões, com maior densidade em regiões mais frias de altas latitudes e densidades menores se aproximando dos trópicos.

Comportamento. As orcas podem viver solitariamente, mas geralmente se organizam em unidades sociais estáveis. Podem viver em grupos de até 20 animais, ocasionalmente formando grupos maiores de até 50 indivíduos. A orca é

um predador de topo de cadeia com dieta variada. Dependendo do ecótipo, pode se alimentar de peixes, cefalópodes, cetáceos ou pinípedes. A variação na dieta também se reflete em diferentes táticas de alimentação. Nas águas oceânicas do Sul e Sudeste do Brasil, foram feitos registros de orcas depredando atuns e dourados durante a pesca por espinhel (DALLA-ROSA & SECCHI, 2007). Também foram observadas tentando predação um filhote de cachalote (*Physeter macrocephalus*) na Bacia de Santos (ANDRIOLO et al., 2015).



Figura II.4.1-1: Orcas (*Orcinus orca*) observadas na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, orcas foram registradas sete vezes no primeiro ano, três vezes no segundo ano e apenas duas vezes no terceiro ano. A maioria dos grupos registrados era composto por indivíduos adultos, mas filhotes e juvenis também foram observados ocasionalmente. Os registros ocorreram principalmente na área do talude, margeando a plataforma continental. Porém, quatro registros ocorreram próximo à costa: um no litoral norte

do Estado de São Paulo, um na região de Bombinhas-SC, e dois na região de Cabo Frio-RJ (Figura II.4.1-2).

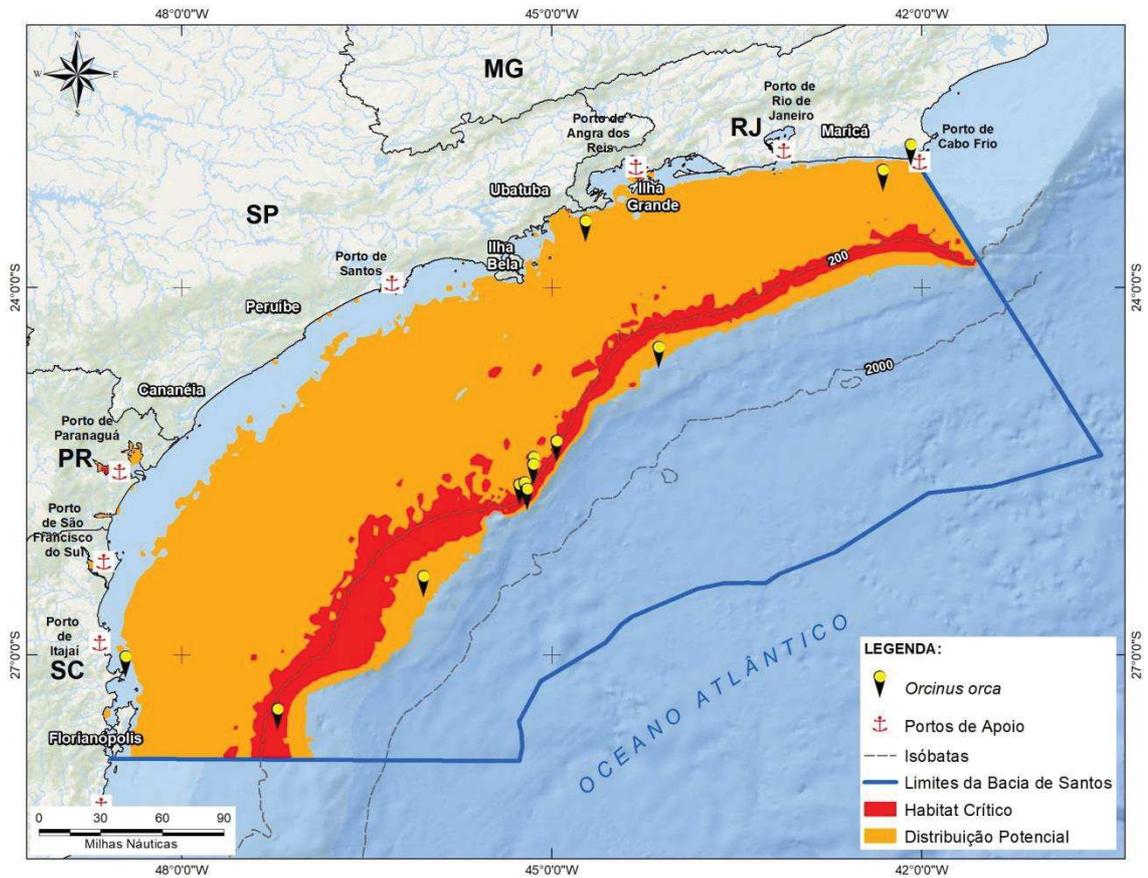


Figura II.4.1-2: Localização dos registros de *Orcinus orca* durante o PMC-BS.

II.4.2 Baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*)

Quadro II.4.2-1: Descrição da baleia-piloto-de-peitorais-curtas, *Globicephala macrorhynchus*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Baleia-piloto-de-peitorais-curtas, <i>Globicephala macrorhynchus</i> Gray 1846	
Tamanho adulto: até 5,5 metros (fêmeas) e até 7,2 metros (machos)	Peso adulto: até 3.600 kg (machos)
Tamanho filhote: até 1,9 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais, subtropicais e temperadas quentes de todos os oceanos	
Caracteres diagnósticos: melão bem pronunciado (principalmente nos machos adultos) que dá a cabeça um formato globoso; rostro extremamente curto; coloração preta a cinza-escura; mancha clara atrás da nadadeira dorsal (“sela”) que podem variar entre os indivíduos, podendo até mesmo estar ausente. Nadadeira dorsal larga na base e arredondada com a borda posterior falcada. A nadadeira peitoral é alongada em forma de foice.	
Comportamento: tamanho de grupo varia de 20-90 indivíduos. Comportamentos acrobáticos são raros e os grupos podem ocasionalmente aproximar-se de embarcações, mas não fazem natação na proa. Podem ser encontrados associados a outras espécies, formando grupos mistos.	
Uso de habitat: áreas oceânicas, talude continental e movimentos sazonais para águas rasas e costeiras.	
Tamanho de grupo: grupos de 20-90 baleias.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): -

Características. A baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*) é a segunda maior espécie da família, atingindo cerca de 7,2 metros de comprimento. Apenas a baleia-orca (*Orcinus orca*) apresenta tamanho do corpo maior. As fêmeas são menores que os machos. Além de seu tamanho e corpo robusto, a baleia-piloto é caracterizada pela cabeça bulbosa. O melão dos machos adultos pode até ultrapassar a altura da mandíbula, sendo menos exacerbado em indivíduos jovens. O rostro é bem curto. A coloração é predominantemente preta ou cinza-escura, com uma mancha branca em forma de

âncora no ventre. Uma linha diagonal branca acima dos olhos e uma “sela” (mancha branca atrás da nadadeira dorsal) podem ser observadas, porém este padrão pode variar entre indivíduos ou áreas geográficas. A nadadeira dorsal está posicionada anteriormente em relação ao corpo; é baixa e arredondada, falcada na parte posterior e base larga. O pedúnculo caudal é bem espesso e uma protuberância após a fenda anal é observada nos machos. A nadadeira peitoral é alongada em forma de foice.

Espécies similares. A distinção entre a baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*) e a baleia-piloto-de-peitorais-longas (*G. melas*) é extremamente difícil no campo. A principal diferença é o tamanho e forma da nadadeira peitoral; de aproximadamente 15% do tamanho do corpo na baleia-piloto-de-peitorais-curtas e a borda anterior apresenta curva suave. Na baleia-piloto-de-peitorais-longas, o tamanho da nadadeira peitoral é de cerca de 20 a 30% do tamanho do corpo; formato com angulação mais pronunciada, como um “cotovelo”. A dificuldade de distinção das espécies torna-se amplificada por causa da variabilidade individual da nadadeira peitoral.

Distribuição. A baleia-piloto-de-nadadeiras-curtas é cosmopolita, sendo encontrada em águas tropicais, subtropicais e temperadas quentes. Ocorrem em águas profundas no talude continental e nas áreas oceânicas, principalmente onde o relevo oceânico é complexo, mas fazem movimentações sazonais e também são observadas em áreas costeiras em algumas partes do mundo, como na Califórnia (OLSON, 2009).

População. Não existe estimativa global de abundância da baleia-piloto-de-peitorais-curtas. Em algumas regiões do mundo, foram estimadas grandes populações da espécie, como no Pacífico Leste Tropical, com estimativa de 500 mil baleias-piloto. No Brasil, são consideradas ocasionais (LODI & BOROBIA, 2013).

Comportamento. Formam grupos de unidades estáveis matrilineares com cerca de 20 a 30 indivíduos, porém agregações maiores podem ser observadas. São nômades, apesar de populações residentes terem sido identificadas (MAHAFFY et al., 2015). A dieta é principalmente constituída de lulas e o forrageio ocorre principalmente no período noturno. Os movimentos entre as

áreas oceânicas e costeiras podem estar associados à distribuição sazonal de lulas (OLSON, 2009). Os mergulhos podem chegar a mais de 1.000 metros, mas a maioria é de mais rasos e com duração de aproximadamente 10 - 15 minutos, podendo chegar a pouco mais de 20 minutos (AGUILAR-SOTO et al., 2008). Esta espécie associa-se frequentemente com outras espécies de cetáceos, como o golfinho-nariz-de-garrafa.



Figura II.4.2-1: Baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*) observada durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC na Bacia de Santos, a baleia-piloto (gênero *Globicephala*) foi registrada em 22 ocasiões, sendo três no primeiro ano, 15 no segundo e quatro no terceiro, todas sem distinção da espécie. A avistagem detectou 12 registros, a maioria no segundo ano e, dentre eles, dois registros de grupos com mais de 10 indivíduos: um com 20 e nenhum filhote, e outro com 40 e

dois filhotes. A distribuição dos registros se concentrou em área oceânica, ocorrendo ocasionalmente no talude (Figura II.4.2-2).

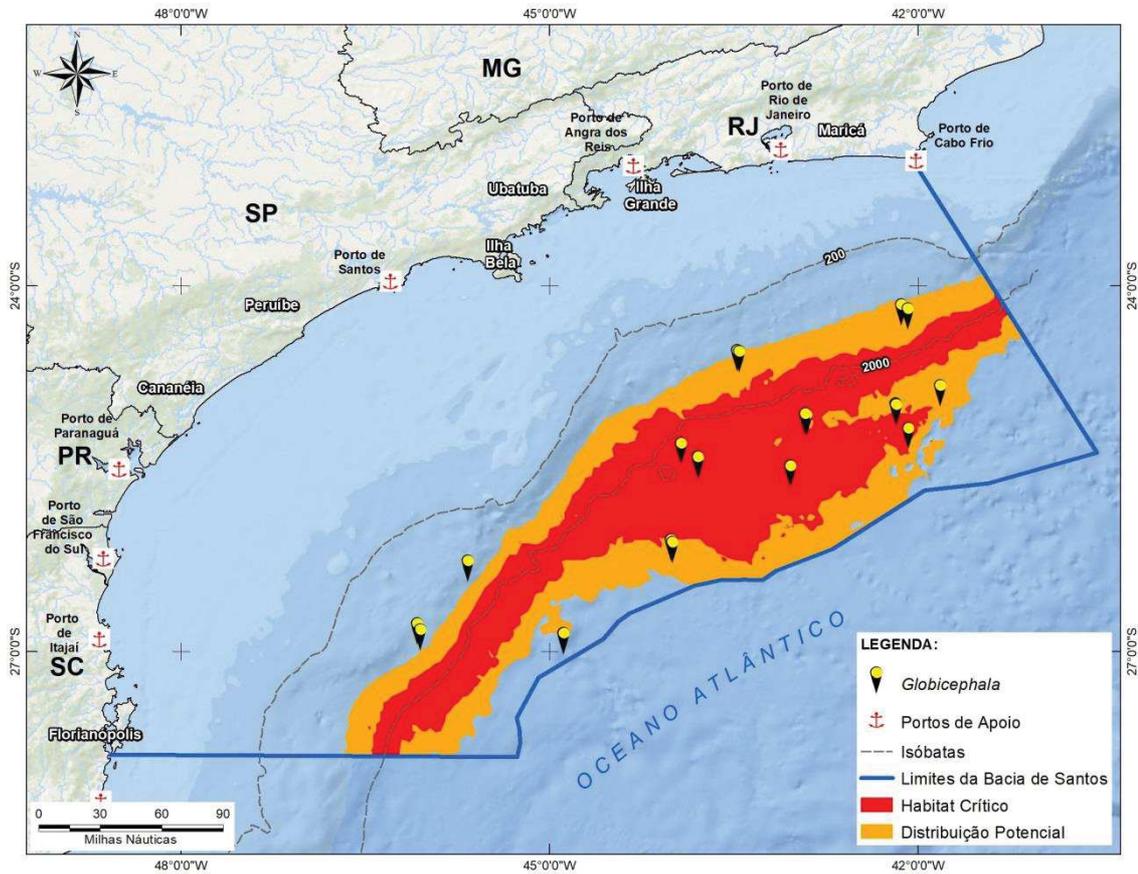


Figura II.4.2-2: Localização dos registros de *Globicephala sp.* durante o PMC-BS.

II.4.3 Baleia-piloto-de-peitorais-longas (*Globicephala melas*)

Quadro II.4.3-1: Descrição da baleia-piloto-de-peitorais-longas, *Globicephala melas*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Baleia-piloto-de-peitorais-longas, <i>Globicephala melas</i> Trail, 1809	
Tamanho adulto: até 6,7 metros (machos) e até 5,7 metros (fêmeas)	Peso adulto: até 3.000 kg (machos) e até 2.000 kg (fêmeas)
Tamanho filhote: até 2,0 metros	Peso filhote: 100 kg
Distribuição: Águas subtropicais, temperadas a subpolares de todos os oceanos, com exceção do Pacífico Norte.	
Caracteres diagnósticos: uma das maiores espécies da família Delphinidae, chegando a 6,7 metros de comprimento; melão bem pronunciado; rostró curto; coloração preta a cinza-escura com mancha branca na região ventral e mancha clara atrás da nadadeira dorsal (“sela”) que pode estar ausente. Nadadeira dorsal arredondada. Nadadeira peitoral longa com a base larga e falcada na extremidade. A angulação da borda anterior da nadadeira peitoral se assemelha a um “cotovelo”, o que dá uma forma de bumerangue à nadadeira.	
Comportamento: tamanho de grupo varia de 20 a 135 indivíduos. Comportamentos acrobáticos são mais comuns entre os juvenis, outros comportamentos incluem <i>spy-hop</i> (exposição da cabeça na posição vertical) e batidas de cauda. São mais ativos durante a noite, quando em forrageio. Podem ser encontrados associados a outras espécies, formando grupos mistos.	
Uso de habitat: áreas oceânicas, talude continental e movimentos sazonais para águas rasas e costeiras.	
Tamanho de grupo: grupos de 2 a 135 baleias.	
Status IUCN (2018): Deficiente em dados	Status MMA (2014): -

Características. A baleia-piloto-de-peitorais-longas (*Globicephala melas*) é uma das maiores espécies da família Delphinidae. Apresentam corpo robusto e a cabeça notavelmente bulbosa. Existe dimorfismo sexual, sendo que os machos são maiores que as fêmeas. Nos machos adultos, o melão pode ultrapassar a altura da mandíbula, sendo menos exacerbado em indivíduos jovens. O rostró é

bem curto. A coloração é predominantemente preta ou cinza-escura, com uma mancha branca em forma de âncora no ventre. Uma linha diagonal branca acima dos olhos e uma “sela” (mancha branca atrás da nadadeira dorsal) podem ser observadas, porém este padrão pode variar entre indivíduos ou áreas geográficas. A nadadeira dorsal é baixa e arredondada, falcada na parte posterior, com a base bem larga. O pedúnculo caudal é bem espesso. A nadadeira peitoral é alongada em forma de foice.

Espécies similares. Duas espécies são reconhecidas no gênero *Globicephala*: baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*) e baleia-piloto-de-peitorais-longas (*G. melas*). A principal diferença é o tamanho e a forma da nadadeira peitoral, que corresponde a aproximadamente 15% do tamanho do corpo na baleia-piloto-de-peitorais-curtas e borda anterior apresenta curva suave. Na baleia-piloto-de-peitorais-longas, o tamanho da nadadeira peitoral é cerca de 20 a 30% do tamanho do corpo; formato com angulação mais pronunciada, como um “cotovelo”. É bastante difícil distinguir as duas espécies em campo, pois as baleias não costumam mostrar a nadadeira peitoral e existe variabilidade individual das características da nadadeira.

Distribuição. A baleia-piloto-de-peitorais-longas é encontrada no Atlântico Norte, incluindo o Mediterrâneo e o Mar do Norte, e é largamente distribuída no Hemisfério Sul. Não ocorre no Oceano Índico e é considerada extinta no Pacífico Norte (KASUYA, 1975; OLSON, 2009). São encontradas em águas mais frias que as baleias-piloto-de-peitorais-curtas, em áreas temperadas e subpolares, apresentando distribuição antitropical. As áreas de sobreposição entre as espécies são as regiões subtropicais. O registro mais ao norte da baleia-piloto-de-peitorais-longas no Brasil é de um crânio encontrado no litoral sul de São Paulo em 1920 (LODI & BOROBIA, 2013). Ocorrem comumente em águas oceânicas e talude continental, principalmente onde o relevo do fundo é complexo, mas podem realizar movimentos sazonais para áreas costeiras de acordo com a distribuição de suas presas (OLSON, 2009).

População. Estima-se que existam cerca de 200 mil indivíduos no verão, ao sul da Convergência Antártica, no Hemisfério Sul. São consideradas de ocorrência rara no Brasil (LODI & BOROBIA, 2013).

Comportamento. Formam grupos de unidades estáveis matrilineares com cerca de 20 indivíduos, mas podem se agregar em mais de uma centena de indivíduos (OTTENSMEYER & WHITEHEAD, 2003). É uma das espécies com mais registros de encalhe em massa, provavelmente pelas afiliações entre os indivíduos das unidades sociais. Aparentemente, permanecem em seu grupo natal ao longo da vida. Forrageiam principalmente no período noturno. A dieta é basicamente constituída de lulas, mas também podem consumir algumas espécies de peixes. Os movimentos entre as áreas oceânicas e costeiras podem estar associados à distribuição sazonal de lulas. Quando em descanso/socialização, os grupos permanecem coesos e boiando na superfície do mar (OLSON, 2009). Os mergulhos podem chegar a mais de 800 metros, mas a maioria é de mais rasos (menos de 20 metros) e podem durar até 18 minutos (HEIDE-JØRGENSEN et al., 2002). Podem ocorrer associados a outras espécies formando grupos mistos.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC na Bacia de Santos, a baleia-piloto (gênero *Globicephala*) foi registrada em 22 ocasiões, sendo 3 no primeiro ano, 15 no segundo e 4 no terceiro, todas sem distinção da espécie. A avistagem detectou 12 registros, a maioria no segundo ano e, dentre eles, dois registros de grupos com mais de 10 indivíduos: um com 20 e nenhum filhote, e outro com 40 e dois filhotes. A distribuição dos registros se concentrou em área oceânica, ocorrendo ocasionalmente no talude (**Figura II.4.2-2**).

II.4.4 Falsa-orca (*Pseudorca crassidens*)

Quadro II.4.4-1: Descrição da falsa-orca, *Pseudorca crassidens*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Falsa-orca, <i>Pseudorca crassidens</i> Owen, 1846	
Tamanho adulto: até 6 metros	Peso adulto: até 2.000 kg
Tamanho filhote: 1,5 – 2,1 metros	Peso filhote: 80 kg
Distribuição: Águas tropicais a temperadas quentes; regiões oceânicas dos três principais continentes.	
Caracteres diagnósticos: corpo longo, delgado e em forma de charuto; melão arredondado mesmo que estreito quando visto de cima ou de baixo; sem rostro detectável; nadadeira dorsal falcada e delgada apesar de formato variável, e normalmente arredondada na ponta e relativamente pequena em comparação ao comprimento da parte anterior do corpo; as nadadeiras peitorais são estreitas e têm forma característica: com uma curva que lembra um "cotovelo" e extremidades pontudas; nadadeira caudal com a ponta arredondada, porém arqueada na parte posterior, apresenta também característica delgada; coloração com padrão simples, basicamente preta, interrompida apenas por uma mancha cinza clara no ventre em forma de âncora entre as nadadeiras peitorais e por outras manchas claras que podem existir nos lados da cabeça.	
Comportamento: pode nadar vigorosamente; apresenta comportamento ativo e acrobático, podendo saltar e mostrar a cabeça quando vem à superfície; pode acompanhar embarcações; encalhes em massa são comuns; pode interagir com outras espécies, como <i>Tursiops truncatus</i> .	
Uso de habitat: Águas de temperaturas mais quentes, normalmente se distribuem em profundidades relativamente altas e regiões mais oceânicas.	
Tamanho de grupo: normalmente 10 – 50 indivíduos, mas podem chegar a grupos de mais de 100 animais.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. Um dos maiores delfínídeos, alcançando até 6 metros de comprimento. Cabeça bastante arredondada com melão avançando

anteriormente em relação à boca, sem rostro. Nadadeira dorsal falcada e relativamente pequena, com a ponta arredondada. Coloração preta ou cinza-escura. A nadadeira peitoral tem uma corcova na parte anterior, dando um aspecto de “S”.

Espécies similares. Pode ser confundida com outros “blackfish”, que são cetáceos de cor escura, especialmente a orca-pigméia (*Feresa attenuata*) e golfinhos-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*). Entretanto, o tamanho da falsa-orca é bem maior que destas duas espécies. Também pode ser confundida com as baleias-piloto (gênero *Globicephala*). O formato da cabeça, nadadeira dorsal e nadadeiras-peitorais pode ser usado para diferenciar de outras espécies.

Distribuição. Possui distribuição global, de regiões tropicais a temperadas, mas prefere águas quentes. Geralmente é observada em águas relativamente profundas. No Brasil, já foi avistada na Bacia de Santos em duas ocasiões anteriores ao PMC-BS (DI TULLIO et al., 2016).

População. Há poucas estimativas de abundância no mundo e praticamente não há dados para o Brasil, onde pode ser considerada ocasional (LODI & BOROBIA, 2013). Existem dados consistentes somente para o Pacífico Leste, com estimativas da ordem de dezenas de milhares de indivíduos.

Comportamento. Pode apresentar natação rápida com “porpoising”, nado rápido rente à superfície. Pode se aproximar de embarcações e nadar na proa (*bow-riding*) e também pode ser observada saltando ou expondo a cabeça verticalmente (*spy-hop*). Agrega-se em grupos de 10-50 animais e ocasionalmente pode chegar a grupos de 300 indivíduos.



Figura II.4.4-1: Falsa-orca (*Pseudorca crassidens*) registrada durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. A falsa-orca foi registrada somente duas vezes durante o PMC-BS. O primeiro registro ocorreu no talude continental ao largo de Santos-SP, onde um grupo de aproximadamente 100 indivíduos, dentre eles um filhote, foi avistado. O segundo registro ocorreu na região oceânica, onde quatro indivíduos foram detectados e um deles era filhote. (**Figura II 4.4-2**).

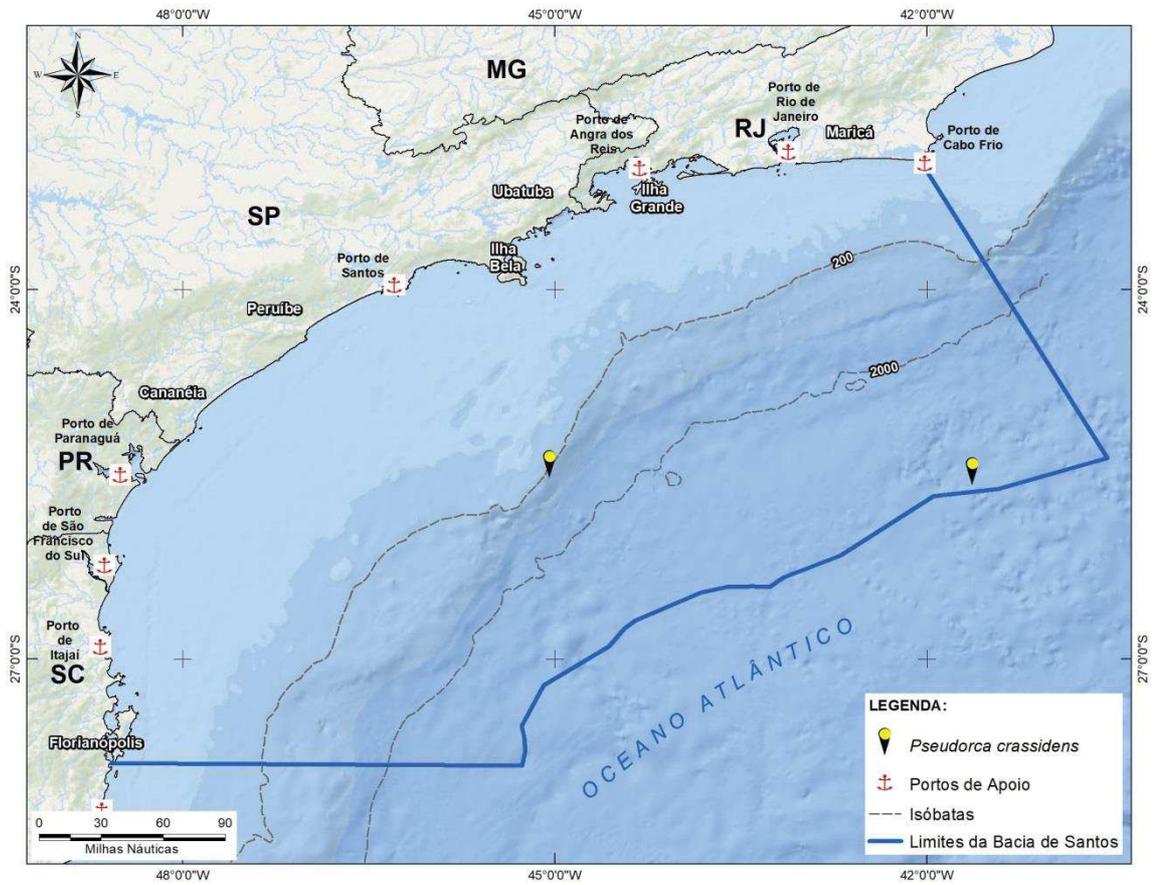


Figura II.4.4-2: Localização dos registros de *Pseudorca crassidens* durante o PMC-BS.

II.4.5 Orca-pigméia (*Feresa attenuata*)

Quadro II.4.5-1: Descrição da orca-pigméia, *Feresa attenuata*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Orca-Pigméia, <i>Feresa attenuata</i> Gray, 1874	
Tamanho adulto: até 2,7 metros	Peso adulto: até 222 kg
Tamanho filhote: até 0,8 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e subtropicais de todos os oceanos. Geralmente não é observada ao norte de 40°N e ao sul de 35°S.	
Caracteres diagnósticos: corpo delgado a levemente robusto, estreitando-se na parte posterior; coloração preta ou cinza-escura com uma capa dorsal mais escura que o resto do dorso, alargando-se abaixo da nadadeira dorsal; região ventral apresenta manchas brancas; cabeça arredondada e sem rostro; presença de uma mancha branca no contorno da boca; nadadeira dorsal alta e levemente falcada; nadadeira peitoral alongada com pontas arredondadas.	
Comportamento: movimentos lentos e letárgicos se comparados a espécies similares; saltos e natação na proa das embarcações (<i>bow-riding</i>) são raros.	
Uso de habitat: águas oceânicas com profundidades superiores a 500 metros, podendo ocorrer próximo à costa em locais onde a plataforma continental é estreita.	
Tamanho de grupo: 1-70, podendo chegar a várias centenas.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. A orca-pigméia (*Feresa attenuata*) é uma das espécies menos conhecidas de todos os cetáceos. Apresenta uma coloração preta ou cinza-escura, com uma capa dorsal mais escura que o resto do dorso, alargando-se abaixo da nadadeira dorsal. A capa dorsal é bem delimitada. Na região ventral apresenta manchas brancas que podem se alongar desde a boca até a região genital. Outra característica bastante marcante é a ausência de um rostro pronunciado, sendo sua cabeça arredondada. Possui nadadeira dorsal alta e levemente falcada e nadadeira peitoral alongada (40-50 cm) com pontas arredondadas (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. Pode ser confundida com golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), e com menor frequência, com a falsa-orca (*Pseudorca crassidens*). O tamanho da falsa-orca (de até 6 metros) é quase o dobro da orca-pigméia (até 2,7 m), o que pode diferenciar as duas espécies. A distinção entre a orca-pigméia e o golfinho-cabeça-de-melão já é mais difícil, sendo espécies bastante similares de cetáceos. O manto dorsal bem demarcado, distintivo para orca-pigméia, é provavelmente a característica mais fácil para distinguir as mesmas (JEFFERSON et al., 2015). A forma da cabeça (mais arredondada da orca-pigméia quando vista de cima) e das nadadeiras peitorais (com a ponta mais arredondada na orca-pigméia) também são características que podem ajudar na distinção entre estas espécies.

Distribuição. Tem sido registrada em regiões oceânicas tropicais e subtropicais de todos os oceanos, não sendo observada ao norte de 40°N e ao sul de 35°S. As avistagens dessa espécie no Brasil são raras, com apenas quatro registros de encalhes, uma captura acidental e seis avistagens reportadas para os estados de Maranhão, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (LODI & BOROBIA, 2013). Para o litoral norte da Bahia, ROSSI-SANTOS et al. (2006b) descreveram duas avistagens em águas entre 100 e 200 m, com cerca de seis animais adultos.

Comportamento. Poucas informações sobre a biologia da orca-pigméia estão disponíveis no mundo. A maior parte é proveniente de animais encalhados, tendo sido estudada *in situ* pela primeira vez apenas em 1969, no Oceano Índico (LODI & BOROBIA, 2013). Ocorre geralmente em grupos de 1 a 70 indivíduos, embora grupos de centenas já tenham sido avistados. Seus movimentos são lentos e letárgicos, se comparados com espécies similares, como o golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*). Saltos e natação na proa de embarcações (*bow-riding*) são raros (JEFFERSON et al., 2015). ROSSI-SANTOS et al. (2006b) descreveram comportamento de navegação lenta logo abaixo da superfície na avistagem de um grupo de seis indivíduos adultos. Estudos realizados com a espécie no Havaí demonstraram que existe uma organização social similar aos grupos estáveis documentados para orcas, falsas-orcas e baleias-piloto, com fortes padrões de associação a longo prazo (LODI & BOROBIA, 2013).



Figura II.4.5-1: Orca-pigméia (*Feresa attenuata*) observada durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC na Bacia de Santos, a orca-pigméia foi avistada três vezes. No primeiro ano, um grupo de cinco adultos, no segundo ano, outro grupo com seis adultos, e no terceiro ano, o maior grupo registrado com 30 indivíduos, dentre eles um filhote. Ainda houve dois registros da espécie por meio do Monitoramento Acústico Passivo (MAP) rebocado. Todos os registros ocorreram no talude continental (**Figura II.4.5-1**).

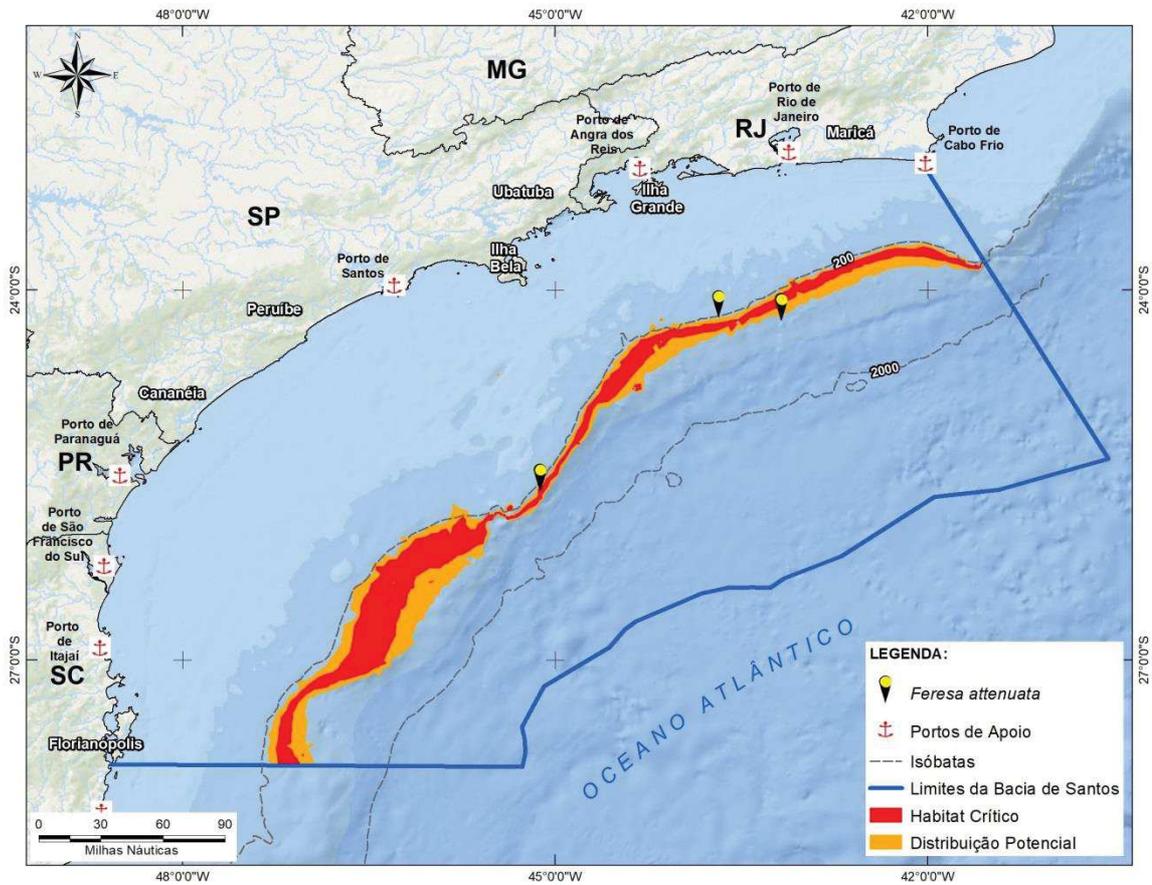


Figura II.4.5-1: Localização dos registros de *Feresa attenuata* durante o PMC-BS.

II.4.6 Golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*)

Quadro II.4.6-1: Descrição do golfinho-cabeça-de-melão, *Peponocephala electra*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Orca, <i>Peponocephala electra</i> (Gray, 1846)	
Tamanho adulto: até 2,8 metros	Peso adulto: até 275 kg
Tamanho filhote: 1 metro	Peso filhote: 15 kg
Distribuição: Águas oceânicas tropicais e subtropicais, entre 40°N e 35°S	
Caracteres diagnósticos: corpo alongado de coloração cinza-escura, com uma estreita capa dorsal mais escura que se alarga abaixo da nadadeira dorsal, e uma mancha mais clara, acinzentada ou branca, em forma de âncora na região da garganta que se estende até a região genital; cabeça pontiaguda em forma de melão, sem um rostro definido, com uma linha branca na região labial dos adultos; nadadeira dorsal alta e falcada; nadadeiras peitorais longas e pontiagudas na extremidade.	
Comportamento: animais sociais; algumas vezes quando fazem mergulho profundos expõem a nadadeira caudal; executam saltos durante deslocamentos rápidos; mostram a cabeça acima da superfície da água verticalmente (<i>spy-hop</i>); batidas de nadadeira caudal e peitoral; e podem mostrar grande interesse por barcos, nadando na proa das embarcações (<i>bow-riding</i>).	
Uso de habitat: ocorrem em águas profundas e geralmente afastadas da costa.	
Tamanho de grupo: grupos podem atingir 100 a 500 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*) possui um corpo alongado de coloração cinza-escura a negra, com manchas brancas na região ventral da cabeça até a região genital, e na linha da boca. A nadadeira dorsal é alta e falcada e as peitorais longas e pontiagudas na extremidade. A cabeça não possui um rostro definido, é triangular quando vista de cima, e de perfil é arredondada, assemelhando-se com a forma de um melão. Os adultos apresentam uma coloração mais escura em torno dos olhos, que se estende ao longo do melão, como uma máscara. O melão dos machos é mais bulboso, a nadadeira dorsal mais alta e a peitoral maior que as fêmeas, além de

apresentarem uma protuberância após a fenda anal (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. O golfinho-cabeça-de-melão pode ser confundido com a orca-pigméia (*Feresa attenuata*) por causa de seu padrão de coloração escuro e tamanho de corpo. As principais diferenças para a identificação correta da espécie estão na presença do manto dorsal bem demarcado e na cabeça mais bulbosa/arredondada quando vista de baixo na orca-pigméia. As nadadeiras peitorais pontiagudas (com a ponta mais arredondada na orca-pigméia) também são características que podem ajudar na distinção entre estas espécies.

Distribuição. A espécie possui uma distribuição pantropical (PERRYMAN, 2002), coincidindo com a distribuição da orca-pigméia (*Feresa attenuata*) nas águas oceânicas tropicais e subtropicais, entre 40°N e 35°S (JEFFERSON & BARROS, 1997). Os golfinhos-cabeça-de-melão são frequentemente encontrados em águas oceânicas profundas, e existem populações associadas a ilhas oceânicas (JEFFERSON et al., 2015; MARTIEN et al. 2017). No Brasil, pouco ainda se conhece sobre a biologia e distribuição da espécie, sendo os dados provenientes de escassos registros de avistagens e enalhes em massa para a costa de São Paulo, Bahia, Ceará e Arquipélago de Fernando de Noronha (LODI & BOROBIA, 2013).

População. É estimado um número mínimo de 52.000 golfinhos cabeça-de-melão em todo o mundo (TAYLOR et al., 2008). Mas algumas destas estimativas são antigas (e.g., Pacífico Oriental - WADE & GERRODETTE, 1993), enquanto há áreas sem a existência de dados populacionais, como o Oceano Atlântico Sul, partes do Oceano Pacífico e partes do Oceano Índico.

Comportamento. A espécie vem sendo registrada em grupos que variam de 8 a 500 animais, embora grupos de até 2.000 animais tenham sido registrados (LODI & BOROBIA, 2013). Os membros do grupo demonstram grande coesão quando observados no mar. Geralmente apresentam natação rápida (*porpoising*), podendo realizar a natação junto a proa de embarcações (*bow-riding*) e algumas vezes saltos, batidas de nadadeira caudal e outros comportamentos de superfície (como periscópio, ou seja, exposição da cabeça verticalmente acima da superfície). O golfinho-cabeça-de-melão pode ser observado em associação com

outras espécies como o golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*), o golfinho-rotador (*Stenella longirostris*), o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) e o golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*), entre outros (LODI & BOROBIA, 2013).



Figura II.4.6-1: Golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*) observado durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, o golfinho-cabeça-de-melão foi registrado somente no terceiro ano. Foram dois registros, um em fevereiro e outro em abril de 2018. Em fevereiro, foi registrado um grupo de 120 indivíduos na região oceânica. Este grupo estava associado à um grupo de golfinho-de-fraser (*Lagenodelphis hosei*). Em abril, foi registrado um grupo de 300 indivíduos no talude continental. Este grupo também estava em interação interespecífica, com golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*). Os dois grupos continham filhotes (**Figura II.4.6-2**).

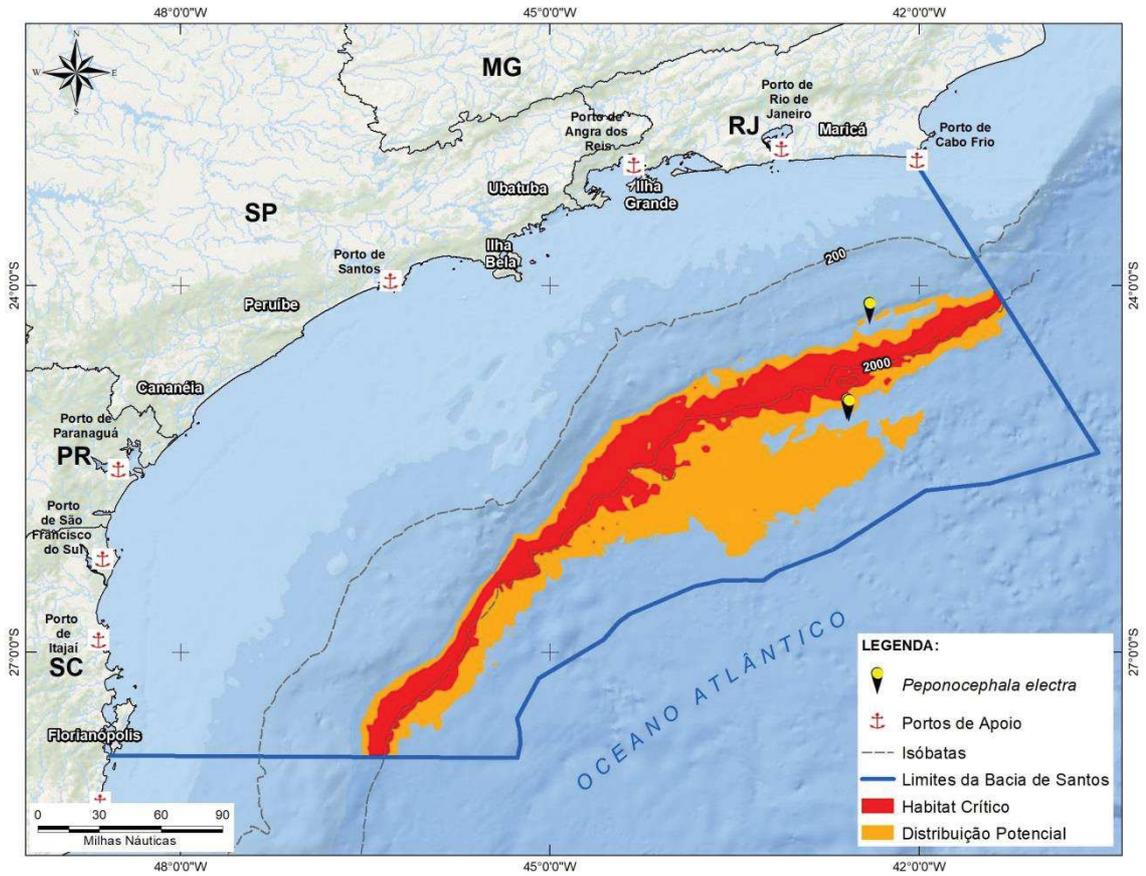


Figura II.4.6-2: Localização dos registros de *Peponocephala electra* durante o PMC-BS.

II.4.7 Golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*)

Quadro II.4.7-1: Descrição do golfinho-de-Risso, *Grampus griseus*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-de-Risso, <i>Grampus griseus</i>, G. Cuvier, 1812	
Tamanho adulto: até 3,8 metros	Peso adulto: até 500 kg
Tamanho filhote: 1,2 a 1,5 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e regiões temperadas de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: chega a 3,8 metros de comprimento; cabeça com formato globoso; parte anterior do corpo robusta, e afila-se após a nadadeira dorsal alta e falcada; o dorso e parte do flanco são cinza-escuros, e o ventre é mais claro; os adultos são tipicamente cobertos com numerosas cicatrizes, chegando a ficar esbranquiçados.	
Comportamento: deslocam-se lentamente, mas podem se mover rapidamente por trechos curtos; raramente são observados nadando junto às embarcações (<i>bow-riding</i>); avistados frequentemente junto a outros cetáceos.	
Uso de habitat: possuem preferência por locais sobre o talude continental, com relevo de fundo acidentado, entre 400 e 1.000 metros de profundidade.	
Tamanho de grupo: 12 a 40 indivíduos, 25 em média. Ocasionalmente, grupos de centenas (até 4.000) de indivíduos podem ser observados.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*) é o quinto maior membro da Família Delphinidae, com machos e fêmeas atingindo 3,8 metros de comprimento. O formato do corpo é bastante característico, sem dimorfismo sexual. A parte anterior do corpo é bastante robusta, e se afila após a nadadeira dorsal. O dorso é cinza-escuro e a região ventral é mais clara, com uma mancha branca entre as nadadeiras peitorais. A cabeça possui um formato globoso, com uma prega vertical na superfície anterior do melão. A linha da boca é curvada para cima e o rosto é quase imperceptível. A nadadeira dorsal é alta (até 50 cm de altura) e falcada, sendo uma das maiores em proporção ao tamanho do corpo

entre os cetáceos. A nadadeira peitoral é comprida com extremidade pontiaguda. Cicatrizes e arranhões nas regiões dorsal e lateral do corpo começam a aparecer na fase subadulta. Os adultos podem ficar com o corpo todo coberto por arranhões e cicatrizes, um aspecto característico da espécie (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. A distância, pode ser confundido com o golfinho-nariz-de-garrafa ou orca (fêmeas e juvenis) pela nadadeira dorsal alta e falcada. Difere do golfinho-nariz-de-garrafa, pois não apresenta o rostro comprido e, no caso da orca, pelo padrão de coloração típico dessa última. Observadores inexperientes podem confundir o golfinho-de-Risso com orca-pigméia, falsa-orca ou golfinho-cabeça-de-melão. No entanto, estas espécies são geralmente de coloração mais escura. A combinação de coloração clara, com extensas marcas e arranhões, e cabeça globosa, são características que distinguem o golfinho-de-Risso de outras espécies.

Distribuição. A espécie ocorre em águas temperadas e tropicais entre 60°N e 60°S, em todos os oceanos, em regiões entre 400 e 1.000 metros de profundidade (JEFFERSON et al., 2015). Existem poucos registros de avistagens no Brasil, mas a maioria em áreas oceânicas (LODI & BOROBIA, 2013).

População. Não existem informações sobre a população global, apenas algumas estimativas para áreas específicas. O *status* de conservação da espécie é considerado de baixo risco pela ampla distribuição por todos os oceanos e abundância alta para algumas áreas conhecidas (IUCN, 2018).

Comportamento. Indivíduos de golfinho-de-Risso já foram observados interagindo com petrechos de pesca, mas evitam embarcações e raramente nadam junto à proa (LODI & BOROBIA, 2013). Deslocam-se lentamente, mas ocasionalmente são vistos em natação rápida rente à superfície (JEFFERSON et al., 2015). Organizam-se em grupos compostos por 12 a 40 indivíduos. Agregações de centenas a milhares de indivíduos (até 4.000) podem ser observadas ocasionalmente. Agregações mistas com outras espécies de odontocetos também podem ocorrer (REEVES et al., 2002). A dieta pode variar com a idade e o sexo (COCKCROFT et al., 1993). No entanto, consomem preferencialmente cefalópodes (REEVES et al., 2002).



Figura II.4.7-1: Golfinhos-de-Risso (*Grampus griseus*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. O golfinho-de-Risso foi frequente na Bacia de Santos, com 29 registros. Os registros variaram desde indivíduos solitários até grupos com 100 indivíduos, muitas vezes com a presença de filhotes. A distribuição dos registros se concentrou na área do talude, ocasionalmente ocorrendo próximo à região oceânica (**Figura II.4.6-2**). Em uma ocasião, foi observado um grupo misto, associado ao golfinho-de-dente-rugosos (*Steno bredanensis*). Em seis ocasiões, foram feitos registros do comportamento acústico do golfinho-de-Risso, sendo um deles de grupo misto. Os cliques e buzzes foram mais comuns. Os assovios estavam presentes durante comportamentos de socialização em grupos maiores (até 100 indivíduos).

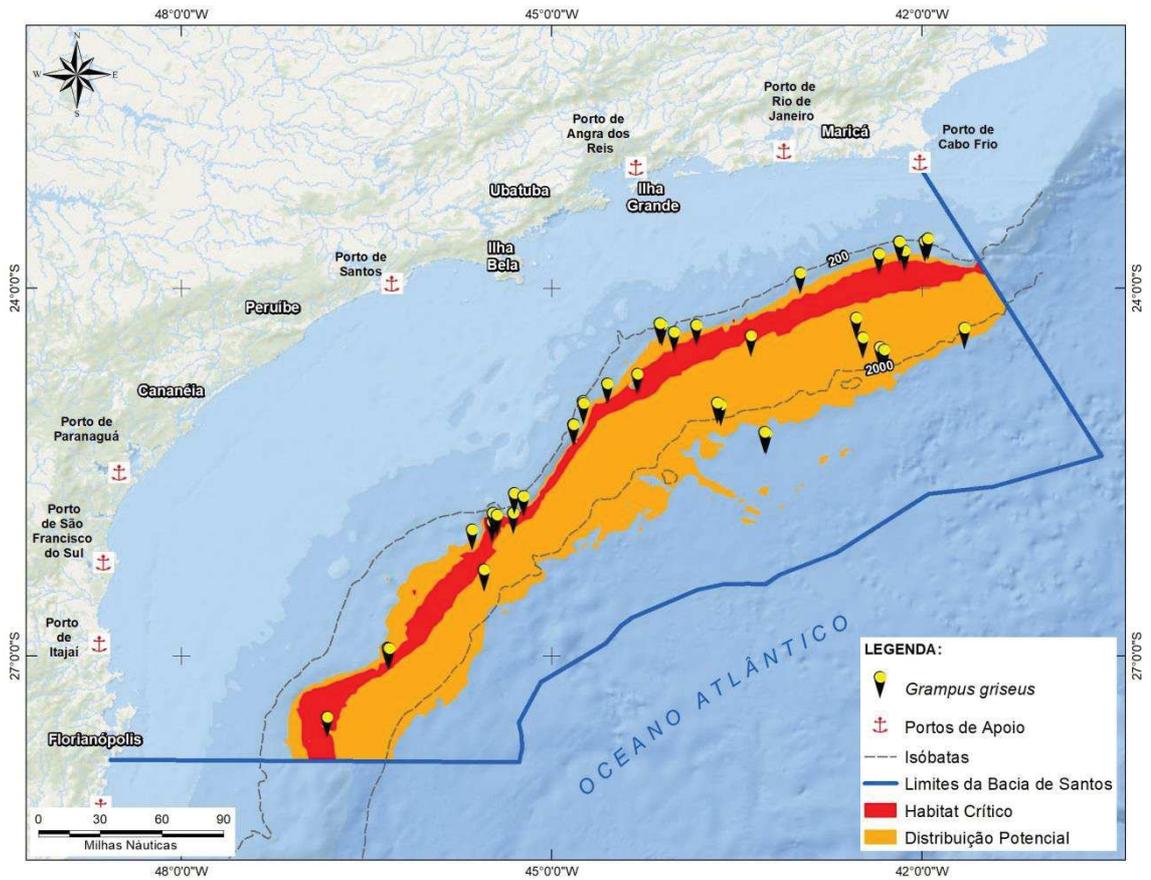


Figura II.4.7-2: Localização dos registros de *Grampus griseus* durante o PMC-BS.

II.4.8 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Quadro II.4.8-1: Descrição do boto-cinza, *Sotalia guianensis*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Boto-cinza, <i>Sotalia guianensis</i> (Van Bénéden, 1864)	
Tamanho adulto: 1,7 a 2,2 metros	Peso adulto: 65 a 121 kg
Tamanho filhote: 0,9 a 1,0 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Costa Atlântica tropical e subtropical da América do Sul e América Central, ocorrendo deste Honduras (14°N) até o sul do Brasil (27°S).	
Caracteres diagnósticos: corpo pequeno, de coloração acinzentada, sendo o dorso mais escuro. A região ventral é mais clara, chegando a tons rosados, principalmente em animais jovens. A nadadeira é pequena e triangular, com a base larga. O melão é levemente arredondado, com rostro bem definido.	
Comportamento: apresentam muitos comportamentos aéreos, como saltos, batidas de cauda e exposição de cabeça, mas não realizam natação junto à proa de embarcações; para algumas populações já foi descrita uma alta fidelidade a determinados habitats costeiros; a estrutura social de algumas populações já foi descrita como sendo de fissão-fusão.	
Uso de habitat: ocorrem em regiões estuarinas e costeiras da plataforma continental, em águas com profundidade geralmente inferior a 30 metros. A espécie se afasta mais da costa na região do Arquipélago de Abrolhos, podendo ser observada a cerca de 70 km do continente.	
Tamanho de grupo: em geral, formam grupos pequenos de 2 a 3 indivíduos, entretanto grupos grandes, com até 450 animais, podem ser observados em algumas localidades.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Vulnerável

Características. É um golfinho de pequeno porte com um padrão de coloração predominantemente acinzentado na região dorsal e coloração mais clara na região ventral, podendo chegar até a cor branca ou rosada. O melão é ligeiramente arredondado e o rostro levemente alongado e estreito. A nadadeira dorsal é pequena e triangular, localizada no centro do dorso (LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. O boto-cinza tem uma morfologia muito semelhante ao golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), mas este é muito maior e tem uma nadadeira dorsal mais falcada. A espécie pode ser confundida com o tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) na região da desembocadura do Rio Amazonas e, neste caso, o reconhecimento em campo pode ser impossível.

Distribuição. O boto-cinza ocorre na costa Atlântica tropical e subtropical, desde a Nicarágua até Florianópolis, no sul do Brasil (América Central e América do Sul). É um golfinho de hábitos costeiros, frequentando baías, enseadas e estuários (SILVA & BEST, 1996). A espécie também já foi registrada próximo de algumas ilhas do Caribe e a 70 km do continente, no Arquipélago de Abrolhos, Nordeste do Brasil.

População. Foram realizadas estimativas de abundância em habitats específicos, em baías e enseadas da costa brasileira, onde ocorrem populações residentes da espécie. As populações são geralmente pequenas, entre 50 e 250 indivíduos (CREMER & SIMÕES-LOPES, 2008; CANTOR et al., 2012; AZEVEDO et al., 2017), com algumas populações maiores como a da Baía de Sepetiba, cuja estimativa foi de 1.269 indivíduos (FLACH et al., 2008). Não existe uma estimativa global para a espécie.

Comportamento. Apresentam muitos comportamentos aéreos, como saltos, batidas de cauda e exposição da cabeça. Para alimentação, em geral formam grupos cooperativos. Não costumam nadar na proa de embarcações (*bow-riding*), mas podem se aproximar dos barcos. Alimentam-se principalmente de peixes e cefalópodes. As populações que vivem em baías e estuários apresentam uma fidelidade elevada a estas áreas e utilizam o habitat de forma bastante heterogênea. Em geral, formam grupos pequenos, com 2 a 5 indivíduos, porém em algumas regiões já foram registrados grupos com até 450 indivíduos.



Figura II.4.8-1: Botos-cinza (*Sotalia guianensis*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. O boto-cinza foi registrado 18 vezes durante os dois primeiros anos do PMC-BS, sempre em grupos que variavam de dois a 50 indivíduos. A presença de filhotes foi constante entre os grupos. Durante uma Campanha de Sobrevoos e uma de Avistagem Embarcada, quatro registros foram efetuados em área próxima e tempo curto, podendo indicar subgrupos de um grupo maior para as respectivas ocasiões. Sua ocorrência foi restrita a áreas costeiras, com destaque para as proximidades da Baía de Paranaguá (**Figura II.4.7-2**).

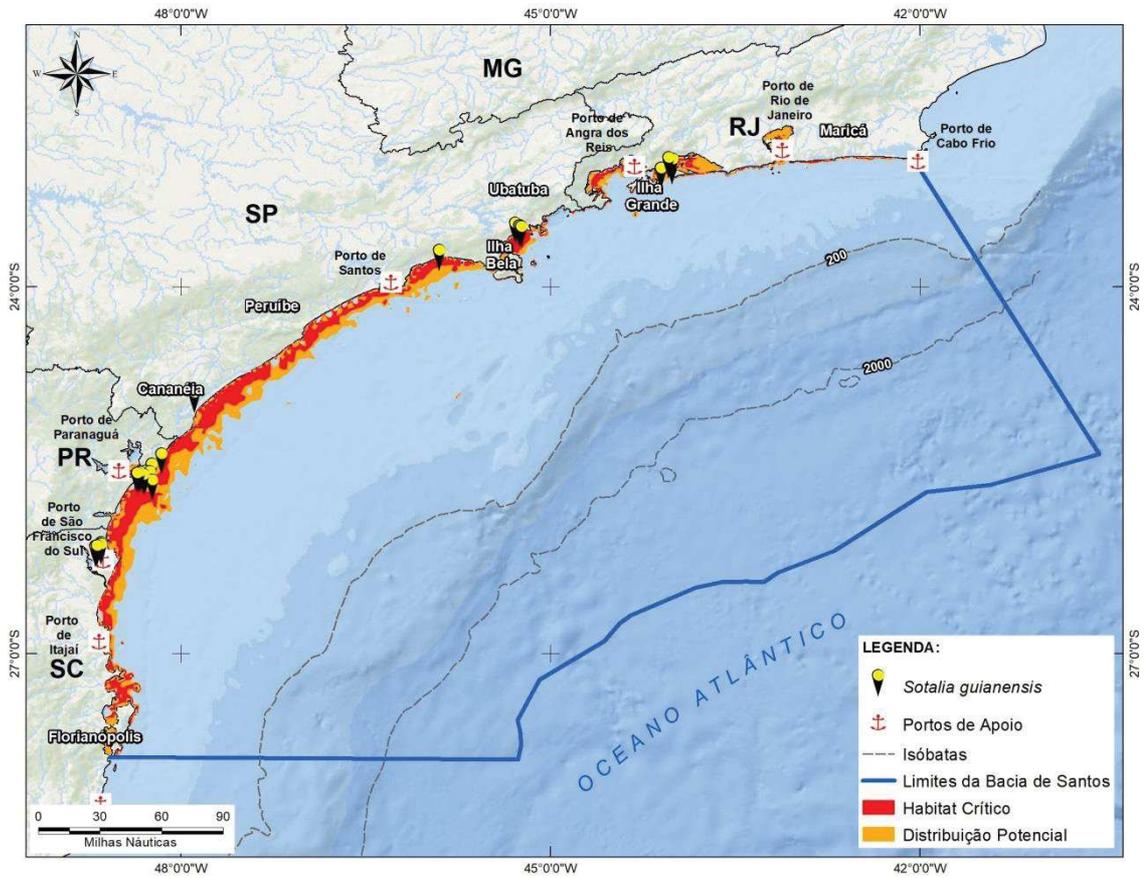


Figura II.4.8-2: Localização dos registros de *Sotalia guianensis* durante o PMC-BS.

II.4.9 Golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*)

Quadro II.4.9-1: Descrição do golfinho-de-dentes-rugosos, *Steno bredanensis*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-de-dentes-rugosos, <i>Steno bredanensis</i> Lesson, 1828.	
Tamanho adulto: 2,2 a 2,3 metros	Peso adulto: ~122 kg
Tamanho filhote: ~ 1 metro	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e subtropicais de todos os oceanos.	
Caracteres diagnósticos: cabeça cônica, sem distinção entre o melão e rosto; corpo de coloração cinza-escuro com manto dorsal bem demarcado que se estreita na altura da nadadeira peitoral; frequentemente tem os lábios brancos; flancos com padrão intermediário de cinza-claro e região ventral branca ou rosa pálido, podendo apresentar manchas esbranquiçadas irregulares; nadadeira peitoral grande e pontiaguda; nadadeira dorsal grande e falcada.	
Comportamento: podem ser observados nadando na proa de embarcações; eventualmente podem ser observados manipulando suas presas na superfície; têm comportamento curioso, podendo demonstrar interesse e interagir com objetos flutuantes; frequentemente se associam com outras espécies de cetáceos, como o golfinho-nariz-de-garrafa e a baleia-jubarte.	
Uso de habitat: geralmente habita águas oceânicas, mas no Brasil é frequentemente encontrado em águas costeiras.	
Tamanho de grupo: geralmente em grupos de 10 a 20 indivíduos (média = 5), chegando até 18 golfinhos e eventualmente se agregando em grupos de mais de 100 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Não consta

Características. O golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) apresenta comprimento total do corpo entre 2 m e 2,6 m nos adultos. O caractere diagnóstico é a cabeça com padrão típico de forma cônica, estreita e alongada, sem uma separação clara entre o melão e o rosto. Outra característica marcante é o manto dorsal bem demarcado, com uma nítida separação entre a região mais clara do ventre e mais escura do dorso. Este manto dorsal se estreita na altura da nadadeira peitoral (JEFFERSON et al., 2015). O flanco é cinza-claro e o ventre é

branco ou rosa pálido, podendo apresentar manchas irregulares por todo o corpo. A mandíbula, a linha da boca e a extremidade do rostro podem ser esbranquiçadas. A linha da boca é comprida, quase até o olho. A nadadeira peitoral é grande e pontiaguda, posicionada mais posteriormente que em outros delfínidos. A nadadeira dorsal é proeminente e moderadamente falcada (LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. A forma característica da cabeça e o manto dorsal facilitam a identificação, mas ela pode ser confundida com outros pequenos cetáceos, como o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), golfinho-pintado (*Stenella frontalis*) e golfinho-rotador (*Stenella longirostris*).

Distribuição. Distribui-se por todo o globo, desde regiões tropicais a temperadas quentes, raramente observado acima de 40°N e abaixo de 35°S (SHIRIHAI & JARRET, 2006). Na maior parte de sua distribuição, habita apenas águas oceânicas. No Brasil, o golfinho-de-dentes-rugosos tem sido observado tanto em águas costeiras e rasas (LODI & HETZEL, 1998; WEDEKIN et al., 2004; ROSSI-SANTOS et al., 2006a), como em regiões oceânicas (WEDEKIN et al., 2014). Estudos de identificação individual reportam movimentos de até 120 km no Sudeste do Brasil (LODI et al., 2012).

População. Há poucas estimativas de parâmetros populacionais para esta espécie. Estima-se um número de 145.000 indivíduos para o Pacífico leste tropical (WADE & GERRODETTE 1993); 2.746 indivíduos para o Golfo do México (WARING et al., 2008); e 19.904 para uma população regional no Havaí (CARRETTA et al., 2006). Tendências populacionais são desconhecidas. Não há estimativas populacionais no Brasil, embora um estudo sistemático, no Sudeste, identificou um padrão de fidelidade ao uso da área entre Rio de Janeiro e Cabo Frio (LODI et al., 2012).

Comportamento. Os grupos observados na costa brasileira são geralmente pequenos, de 10 a 20 indivíduos (LODI & HETZEL, 1999; ROSSI-SANTOS et al., 2006a). Realizam saltos variados, expõem com frequência a cabeça para fora da água. Podem mergulhar por até 15 minutos (CARWARDINE, 2002). Aproximam-se de embarcações para nadar na proa (*bow-riding*). Forrageiam em grupo para cooperar na captura de presas, cercando cardumes contra a costa ou realizando

movimentos circulares sincronizados (KUCZAJ & YEATER, 2007). É comum serem observados com outras espécies, como o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*). No Banco dos Abrolhos, o golfinho-de-dentes-rugosos frequentemente interage com a baleia-jubarte quando se alimenta de peixes que são atraídos pelas baleias, como as rêmoras (WEDEKIN et al., 2004).



Figura II.4.9-1: Golfinhos-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Foram realizados 24 registros do golfinho-de-dentes-rugosos na Bacia de Santos durante os três primeiros anos de estudo, sendo seis no primeiro ano, oito no segundo e 10 no terceiro. Ocorreram sempre em grupos, que variaram de dois a 50 indivíduos com a presença ocasional de filhotes. Foram registrados tanto perto da costa (10 registros) quanto em área de talude e próximos à região oceânica (14 registros) (**Figura II.4.9-2**).

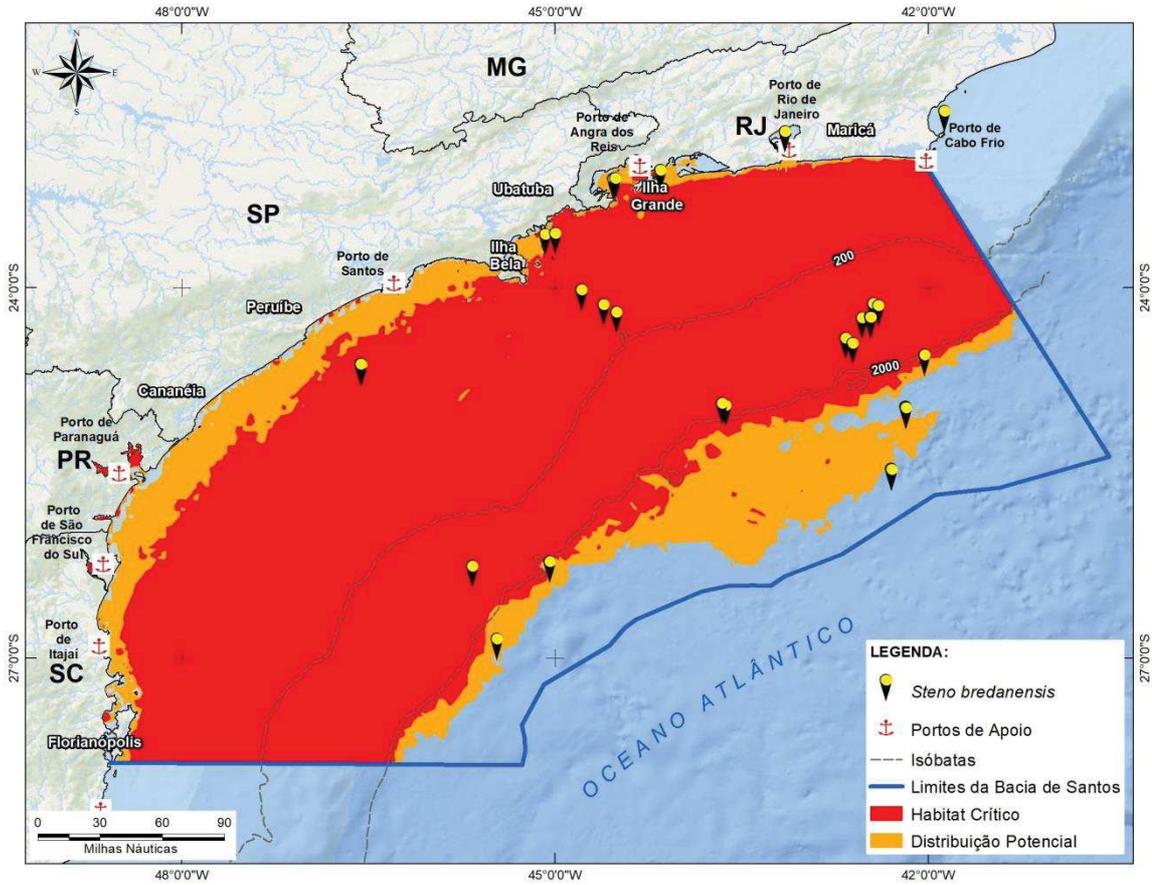


Figura II.4.9-2: Localização dos registros de *Steno bredanensis* durante o PMC-BS.

II.4.10 Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (*Tursiops truncatus*)

Quadro II.4.10-1: Descrição do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum, <i>Tursiops truncatus</i> Montagu, 1821	
Tamanho adulto: até 3,9 metros	Peso adulto: 200 a 350 kg
Tamanho filhote: 1 a 1,3 metros	Peso filhote: 15 a 30 Kg
Distribuição: globalmente abundante; ocorrem tanto em águas tropicais como temperadas.	
Caracteres diagnósticos: coloração cinza-escura no dorso, com ventre branco ou levemente rosado; possuem o rostro curto e nitidamente distinto do melão; nadadeira dorsal falcada (forma <i>offshore</i>) e levemente falcada a triangular (forma costeira); animais <i>offshore</i> adquirem marcas esbranquiçadas no pedúnculo caudal e nadadeira dorsal como resultado de interações sociais.	
Comportamento: podem deslocar-se rapidamente rente à superfície (<i>porpoising</i>); realizam saltos de corpo inteiro quando em deslocamento rápido ou em outros comportamentos, como a pesca; na proximidade de embarcações, podem bater a cauda repetidas vezes na superfície da água; também podem expor a nadadeira caudal antes de um mergulho; associam-se com outras espécies de cetáceos; interagem com objetos; aproximam-se e nadam junto às embarcações (<i>bow-riding</i>); exibem estratégias cooperativas de forrageio.	
Uso de habitat: utilizam baías, lagoas, estuários, desembocaduras de rios e oceanos abertos, podendo ocorrer até a região do talude continental e eventualmente em regiões oceânicas.	
Tamanho de grupo: 1-20 golfinhos, podendo formar grupos com mais de 100 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-nariz-de-garrafa-comum (*Tursiops truncatus*) é, provavelmente, a espécie de pequeno cetáceo mais conhecida e bem estudada no mundo. Os machos tendem a ser mais robustos que as fêmeas, podendo atingir 3,9 metros de comprimento e pesar até 350 kg, com um peso máximo de 500 kg. A coloração do dorso é cinza-escuro, enquanto o ventre é branco ou

levemente rosado. Indivíduos adultos adquirem marcas e cicatrizes como resultado de interações sociais. Possuem o rostro curto, nitidamente distinto do melão, e a curvatura da linha da boca ascendente se assemelha a de um "sorriso" (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015). A nadadeira dorsal é alta e falcada, e está posicionada no meio do dorso. Todavia, existem variações morfológicas conforme o ecótipo: a forma costeira tem nadadeira dorsal levemente falcada a triangular, enquanto a forma *offshore* tem a dorsal bastante falcada (SIMÕES-LOPES et al., 2018). Indivíduos oceânicos tendem a ser maiores que indivíduos costeiros (REEVES et al., 2002; LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. O golfinho-nariz-de-garrafa-comum pode ser confundido com o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*), o golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*) e golfinhos do gênero *Stenella*, especialmente animais juvenis. No entanto, a confusão só ocorre quando os animais são vistos a distância ou muito rapidamente. A espécie é facilmente identificada por uma combinação de características, como o tamanho do corpo, padrão de coloração, forma da cabeça e forma do rostro (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

Distribuição. É uma espécie cosmopolita e globalmente abundante. Pode ocupar uma variedade de habitats como baías, lagoas, estuários e oceanos. O padrão de residência pode variar, mas existem populações altamente residentes e isoladas que no Brasil ocupam baías e estuários da região Sul (DAURA-JORGE et al., 2013; COSTA et al., 2015).

População. No Brasil, a espécie é registrada desde a região Nordeste até a região Sul (LODI & BOROBIA, 2013). Não existem estimativas globais de abundância para a espécie, nem para águas brasileiras. Nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, existem duas populações amplamente estudadas, uma com 88 indivíduos, no estuário da Lagoa dos Patos (FRUET et al., 2015), e uma população residente com 54 indivíduos, em Laguna (DAURA-JORGE et al., 2013).

Comportamento. Possuem uma dieta generalista. Alimentam-se preferencialmente de peixes teleósteos, cefalópodes e crustáceos (REEVES et al., 2002). Podem forragear individualmente, e também exibem estratégias

cooperativas. Costumam formar grupos pequenos, com até 20 indivíduos na forma costeira. Na forma oceânica, tendem a formar agregações maiores, podendo chegar a centenas de indivíduos (REEVES et al., 2002; JEFFERSON et al., 2015). Possuem variado repertório comportamental, realizando saltos totais ou parciais, natação rápida na superfície, exposição de cabeça quando em natação, batida de nadadeira caudal ou exposição da cauda antes de mergulhar. Frequentemente se associam a outras espécies de cetáceos, incluindo baleias e outras espécies de golfinhos.



Figura II.4.10-1: Golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. O golfinho-nariz-de-garrafa foi frequente durante o PMC-BS, com 87 registros efetuados ao longo dos três primeiros anos. Foram avistados desde indivíduos solitários até grupos de 300 animais, muitos com a presença de filhotes. Foram registrados majoritariamente na área costeira, mas

também estiveram presentes na área do talude e plataforma continental, e eventualmente em regiões oceânicas (**Figura II.4.10-2**).

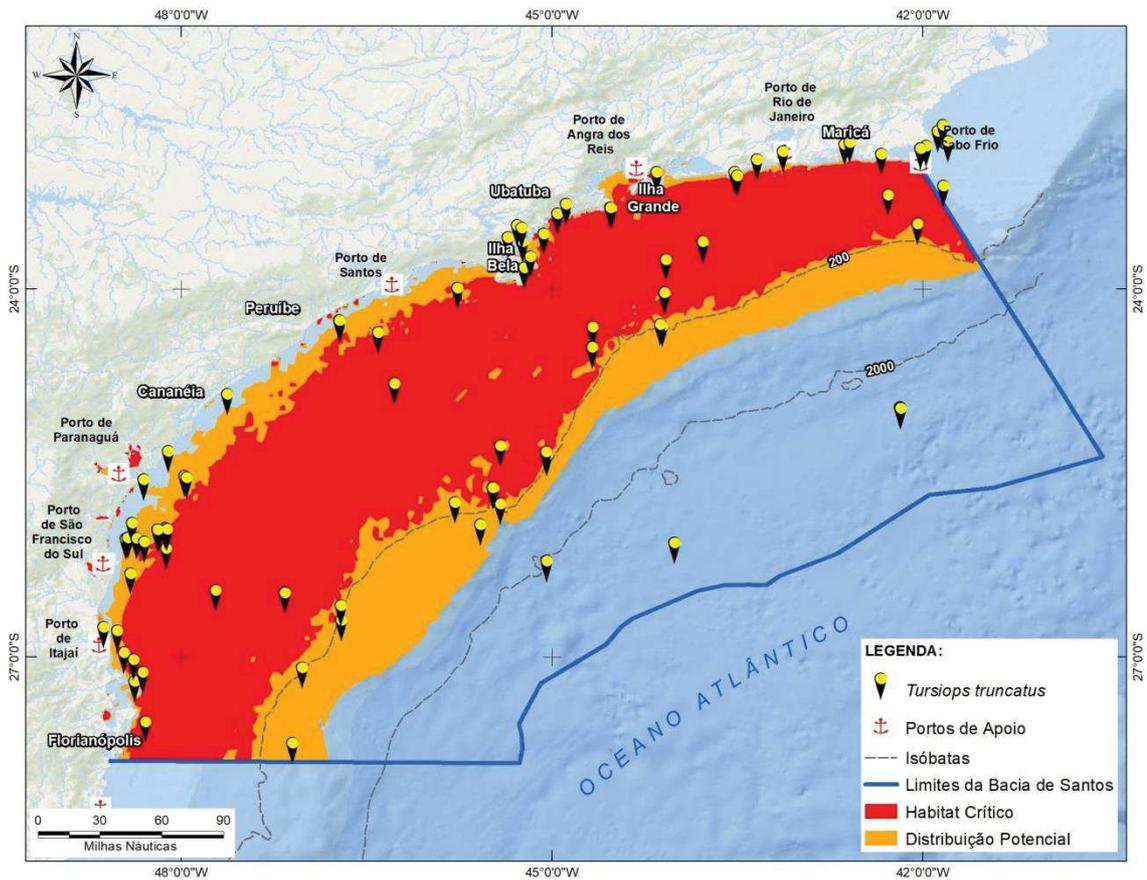


Figura II.4.10-2: Localização dos registros de *Tursiops truncatus* durante o PMC-BS.

II.4.11 Golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*)

Quadro II.4.11-1: Descrição do golfinho-pintado-pantropical, *Stenella attenuata*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-pintado-pantropical, <i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	
Tamanho adulto: 1,8 a 2,6 metros	Peso adulto: 100 a 120 kg
Tamanho filhote: 0,8 – 0,9 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: global, em águas tropicais e temperadas quentes. Entre as latitudes 40°S e 40°N.	
Caracteres diagnósticos: padrão pintado do corpo dos adultos; manto dorsal mais escuro que se alonga em direção ao ventre na região da nadadeira dorsal. Filhotes e juvenis não apresentam manchas no corpo.	
Comportamento: podem formar grupos mistos com outros golfinhos do gênero <i>Stenella</i> ; as agregações desta espécie no Atlântico Sul têm geralmente 25 animais, mas grupos de até 250 golfinhos também são registrados; podem nadar na proa de embarcações (<i>bow-riding</i>); costumam saltar e frequentemente são vistos em natação rápida rente à superfície da água (<i>porpoising</i>).	
Uso de habitat: profundidade mediana de 3.450 metros, ocorrendo entre 850 e 4.900 m.	
Tamanho de grupo: varia entre 3 e 250 golfinhos.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O padrão pintado do corpo de animais adultos é uma característica bastante marcante na espécie. Possui um manto dorsal mais escuro que se alonga na direção do ventre na altura da nadadeira dorsal e sem interrupção - faixa ou reentrância espinhal (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. O gênero *Stenella* apresenta diversas espécies que, à primeira vista, podem ser confundidas, em sua identificação, pela semelhança em tamanho de corpo e comportamento gregário, eventualmente juntando-se em grandes grupos multiespecíficos. Para a correta identificação de *S. attenuata*, deve-se observar bem o padrão de manchas, que difere do golfinho-pintado-do-

Atlântico, associado principalmente com o manto escuro bem determinado em sua posição e sem a faixa mais clara avançando sobre o manto dorsal.

Distribuição. O golfinho-pintado-pantropical habita regiões tropicais e temperadas quentes do mundo (SHIRIHAI & JARRET, 2006). Duas subespécies são reconhecidas: *S. a. attenuata* em águas oceânicas tropicais em todo o mundo, e *S. a. graffmani* nas águas costeiras do Oceano Pacífico tropical oriental (HAMMOND et al., 2012). No Brasil, o golfinho-pintado-pantropical ocorre principalmente em águas do Nordeste e Sudeste até 22°S, e de profundidades além de 850 metros (MORENO et al., 2005).

População. Populações de águas costeiras e oceânicas podem ser observadas em algumas regiões do mundo (JEFFERSON et al., 2015). Em estudo prévio ao PMC-BS, essa espécie foi comum na região do talude continental da Bacia de Santos (DI TULLIO et al., 2016).

Comportamento. O golfinho-pintado-pantropical pode formar grupos mistos com outros golfinhos do gênero *Stenella*, como o golfinho-pintado-do-Atlântico (*S. frontalis*) ou o golfinho-rotador (*S. longirostris*), com a possibilidade de ocorrência de hibridismo entre as espécies. As agregações de *S. attenuata* no Atlântico Sul têm geralmente 25 animais, mas grupos de até 250 golfinhos também são registrados (MORENO et al., 2005). Podem nadar na proa de embarcações (*bow-riding*). Costumam saltar e frequentemente são vistos em natação rápida rente à superfície da água (*porpoising*).



Figura II.4.11-1: Golfinhos-pintados-pantropicais (*Stenella attenuata*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, o golfinho-pintado-pantropical foi registrado 22 vezes, em grupos de até 300 indivíduos e com a presença frequente de filhotes. A distribuição dos registros ocorreu principalmente em área de talude, com registros ocasionais na região oceânica e na plataforma continental. Os registros para a plataforma continental e região oceânica foram próximos para cada região, porém em campanhas diferentes, o que pode significar alguma afinidade dos animais com os locais. (Figura II.4.11-2).

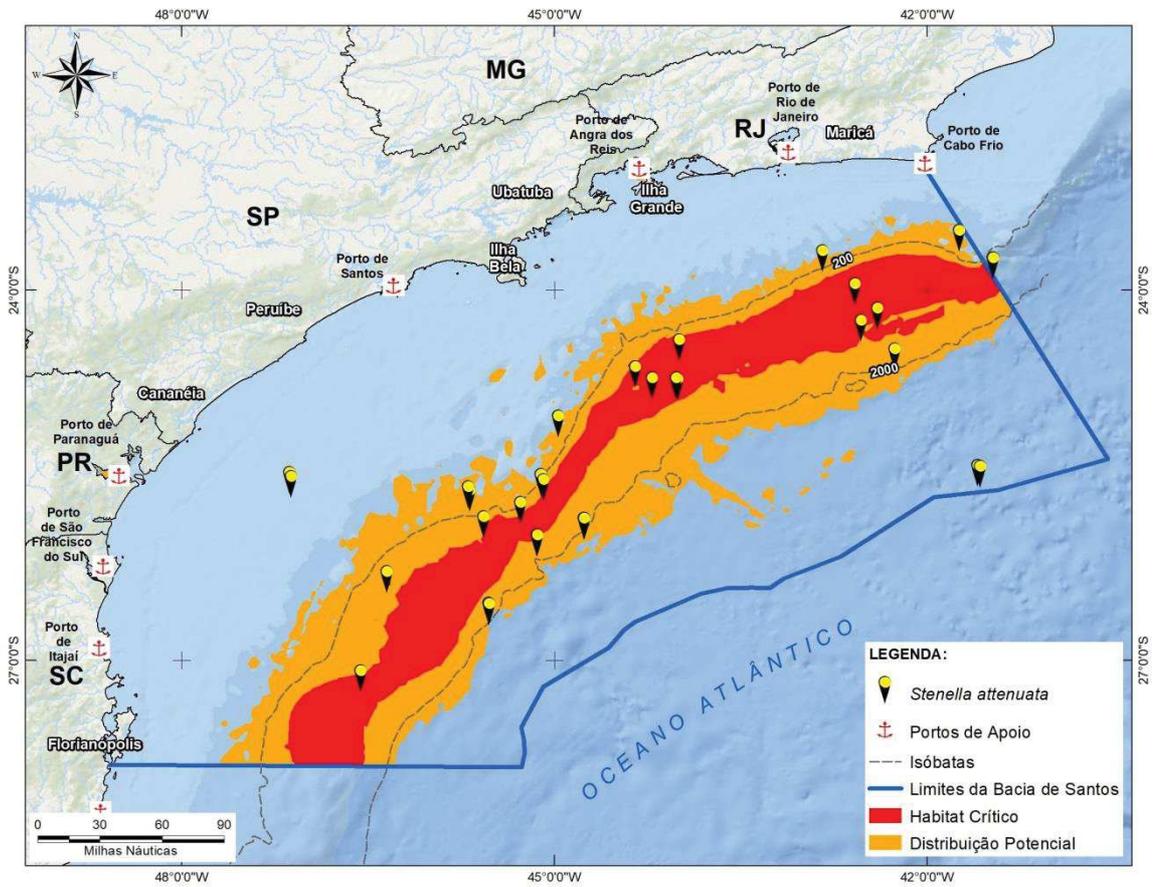


Figura II.4.11-2: Localização dos registros de *Stenella attenuata* durante o PMC-BS.

II.4.12 Golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*)

Quadro II.4.12-1: Descrição do golfinho-pintado-do-Atlântico, *Stenella frontalis*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-pintado-do-Atlântico, <i>Stenella frontalis</i> G. Cuvier, 1829	
Tamanho adulto: até 2,3 metros	Peso adulto: até 143 kg
Tamanho filhote: até 1,2 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico.	
Caracteres diagnósticos: capa dorsal de coloração cinza-escura, flanco cinza-claro e ventre branco; o principal caractere diagnóstico é uma entrada de coloração clara na capa dorsal (<i>spinal blaze</i>) abaixo da nadadeira dorsal; as pintas pelo corpo são mais frequentes nos indivíduos mais velhos e podem estar ausentes em indivíduos jovens. A nadadeira dorsal é alta e falcada; rosto de tamanho médio e melão bem demarcado. O corpo é relativamente robusto comparado às outras espécies do gênero.	
Comportamento: são velozes e acrobáticos, apresentam comportamentos tais como natação rápida (<i>porpoising</i>), saltos, batidas de nadadeira caudal e peitoral e outros comportamentos sociais. Frequentemente se aproximam das embarcações e fazem natação na proa, navegando nas ondas que são formadas (<i>bow-riding</i>). Os grupos são dinâmicos e fluídos e podem estar associados a outras espécies, formando grupos mistos. Os mergulhos duram de 1-7 minutos, e os indivíduos permanecem a maior parte do tempo em profundidades de até 10 m, porém mergulhos de 40-60 m foram registrados.	
Uso de habitat: águas rasas da plataforma continental até 200 m, mas também há registros em áreas oceânicas.	
Tamanho de grupo: 5-50 golfinhos, podendo chegar até 200 golfinhos.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): -

Características. O golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*) apresenta comprimento total do corpo entre 1,65 m a 2,30 m nos adultos. A coloração é semelhante ao golfinho-pintado-pantropical: uma capa dorsal escura, região do flanco cinza-claro e o ventre branco. O caractere diagnóstico é a entrada clara na capa dorsal (*spinal blaze*) localizada abaixo da nadadeira dorsal. As pintas espalhadas pelo corpo são brancas no dorso e pretas no ventre e estão mais

densamente presentes nos indivíduos mais velhos, podendo ocupar o corpo todo. Os indivíduos jovens têm poucas pintas e nos filhotes as pintas estão ausentes. O corpo é relativamente robusto e o rostró é moderadamente longo e mais largo que o do golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*). A dorsal é alta e falcada, e pode apresentar marcas utilizadas para a foto-identificação (PERRIN et al., 1987; LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. Semelhante ao golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*). No entanto, em *Stenella attenuata* o padrão da capa dorsal não tem interrupção e as pintas brancas são menores. Pode ser confundido com outros pequenos cetáceos, como o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), mas a combinação de coloração com muitas pintas e entrada na capa dorsal (*spinal blaze*) é característica da espécie.

Distribuição. O golfinho-pintado-do-Atlântico é endêmico do Oceano Atlântico, encontrado nos Estados Unidos, Golfo do México, Caribe, Brasil e Uruguai na porção oeste. Na porção oriental, são encontrados na África e associados a ilhas nos Açores e Madeira. Apesar de comum em águas de até 200 metros, registros na isóbata de 1.000 metros foram reportados (JEFFERSON & SCHIRO, 1997; PERRIN, 2002, MORENO et al., 2005). No Brasil, pelo menos duas regiões de concentração foram identificadas: região Sul-Sudeste (18° a 33°S), estendendo-se até o sul do Banco de Abrolhos (MORENO et al., 2005; DANILEWICZ et al., 2013) e ao norte, em águas mais tropicais acima de 6°S, havendo uma descontinuidade entre essas áreas (MORENO et al., 2005).

Populações. Existe uma estimativa para o Golfo do México de mais de 30.000 indivíduos. Análises genéticas e descrições iniciais da estrutura populacional indicam a presença de populações diferentes entre o Sul-Sudeste do Brasil e o Caribe (CABALLERO et al., 2013). Tendências populacionais são desconhecidas.

Comportamento. Os grupos são geralmente pequenos (<50 indivíduos), mas observações de grupos de até 200 indivíduos foram registradas (PERRIN, 2002; MORENO et al., 2005; PARO et al., 2014). Frequentemente apresentam comportamentos acrobáticos, como saltos e batidas de nadadeira caudal e nadadeira peitoral. São atraídos por embarcações, aproximando-se para nadar na proa (*bow-riding*). A estrutura de grupo é dinâmica e fluída, e a espécie pode se

associar com outras espécies, formando grupos mistos. Os indivíduos permanecem a maior parte do tempo em profundidades de até 10 metros, porém foram registrados mergulhos de 40-60 metros (PERRIN et al., 2009). O intervalo reprodutivo é de cerca de três anos (LODI & BOROBIA, 2013). A dieta é variada, incluindo peixes pelágicos e bentônicos, cefalópodes e invertebrados bentônicos (PERRIN et al., 1987).

A espécie produz uma variedade de assovios. Foram encontrados grupos bastante ativos vocalmente. Na maior parte das gravações em que a espécie foi confirmada, tantos os assovios quanto os cliques foram comuns. Em apenas um encontro, foram detectados apenas cliques. Gritos e *buzzes* também foram registrados. Os cliques foram registrados em frequências de 20 - 60 kHz.

Registros no PMC-BS. O golfinho-pintado-do-Atlântico foi observado por diversas vezes durante as campanhas na Bacia de Santos, sendo o odontoceto mais avistado com 121 registros. As avistagens variaram de indivíduo solitário até grupos com 200 indivíduos, com a presença frequente de filhotes. A distribuição dos registros demonstra uma ampla ocorrência da espécie ao longo da Bacia de Santos, principalmente da região costeira até o talude continental, com registros ocasionais em região oceânica (**Figura II.4.12-2**).



Figura II.4.12-1: Golfinhos-pintados-do-Atlântico (*Stenella frontalis*) observados na Bacia de Santos.

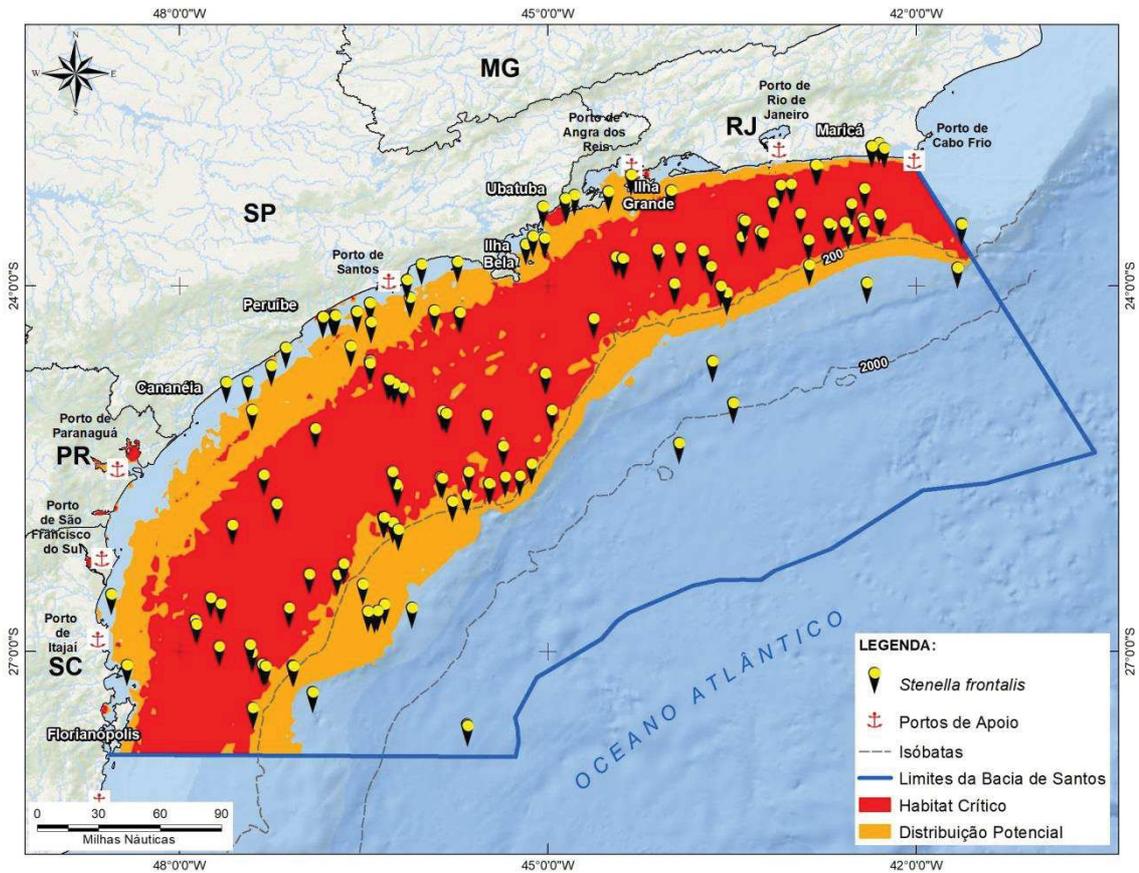


Figura II.4.12-2: Localização dos registros de *Stenella frontalis* durante o PMC-BS.

II.4.13 Golfinho-rotador (*Stenella longirostris*)

Quadro II.4.13-1: Descrição da espécie *Stenella longirostris*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-rotador, <i>Stenella longirostris</i> Gray, 1828	
Tamanho adulto: 1,6 a 2,0 metros	Peso adulto: 60 a 80 kg
Tamanho filhote: 0,7 a 0,8 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: zonas tropicais, subtropicais e temporadas quentes de todos os oceanos, entre as latitudes 40°S e 40°N. Sua distribuição sobrepõe-se com a do golfinho-listrado (<i>S. coerulealba</i>) e do golfinho-de-Clymene (<i>S. clymene</i>) em uma grande extensão da costa do Brasil.	
Caracteres diagnósticos: rostro longo com a parte superior escura e parte inferior branca; corpo esguio; coloração padrão composta de três faixas: capa dorsal cinza-escuro, faixa lateral cinza-clara e ventre branco, formando um padrão em dégradé; nadadeira dorsal alta, triangular e levemente falcada.	
Comportamento: podem formar grupos mistos com outros golfinhos do gênero <i>Stenella</i> ; nadam na proa de embarcações (<i>bow-riding</i>). Costumam saltar frequentemente, muitas vezes rotacionando o corpo no próprio eixo diversas vezes; frequentemente são vistos em natação rápida rente à superfície da água (<i>porpoising</i>).	
Uso de habitat: ocorrem no entorno de ilhas oceânicas e atóis e em áreas pelágicas, com temperaturas da água acima de 25°C e profundidades superiores a 1.000 metros.	
Tamanho de grupo: varia entre 5 e 250 golfinhos (podendo alcançar várias centenas).	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) possui corpo pequeno e esguio, com uma coloração padrão composta por três elementos paralelos: capa dorsal cinza-escuro, faixa lateral cinza-clara e ventre branco, formando um padrão em dégradé. Sua nadadeira dorsal é mais triangular quando comparada aos outros golfinhos do gênero *Stenella*. O rostro é longo e fino, nitidamente separado do melão. Apresenta uma faixa cinza-escuro que se

estende da inserção da nadadeira peitoral ao olho, o qual é circundado por uma mancha coloração mais escura (LODI & BOROBIA, 2013).

Espécies similares. Pode ser confundido com o golfinho-de-Clymene (*S. clymene*), golfinho-pintado-pantropical (*S. attenuata*), golfinho-listrado (*S. coeruleoalba*) e golfinhos-comum (*Delphinus* spp.). A coloração característica (padrão dégradé) e o rostro longo permitem confirmar a identificação do golfinho-rotador.

Distribuição. Habita regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Sua distribuição é basicamente oceânica, no entorno de ilhas oceânicas e atóis, e em áreas pelágicas, com temperaturas da água acima de 25°C e profundidades superiores a 1.000 metros. Podem ser avistados na região do talude no Sul e Sudeste do Brasil (DI TULLIO et al., 2016; LODI & BOROBIA, 2013).

População. No Brasil, existe uma população residente de golfinhos-rotadores bem conhecida que habita o arquipélago de Fernando de Noronha, onde os animais buscam as águas abrigadas de uma baía na ilha para atividades de socialização e descanso (SILVA-JR & SAZIMA 2008). Ao longo da costa, a ocorrência da espécie já foi confirmada com avistagens em diferentes estados, do Sul, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e Sudeste, como São Paulo e Rio de Janeiro. Também foram observados no Nordeste, nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Ceará (LODI & BOROBIA, 2013).

Comportamento. Vivem em grupos com associações fluídas, mudando o tamanho e a composição dos grupos com frequência. No Atlântico Sul, formam grupos de até 50 animais, mas grupos de até 250 golfinhos também já foram registrados. Frequentemente se associam a outras espécies, como *S. frontalis* e *S. attenuata*. A espécie é conhecida pela sua natação rápida, comportamento ágil e ativo, sendo uma das mais acrobáticas de todos os cetáceos, executando vários comportamentos aéreos. O golfinho-rotador pode girar até sete vezes ao saltar em torno do eixo longitudinal de seu corpo, a uma altura de até três metros acima da superfície da água. Tais giros, geralmente, são executados em séries, podendo ser intercalados com outros comportamentos aéreos, que também servem como sinais acústicos de comunicação. Quando se desloca em

velocidade, pode executar pequenos saltos curtos e rápidos (*porpoising*). Se aproxima de embarcações para nadar junto a proa (*bow-riding*) ou nas proximidades (LODI & BOROBIA, 2013).



Figura II.4.13-1: Grupos do golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, houve 42 registros de golfinho-rotador, sendo uma das espécies mais frequentes de delfínido. O tamanho dos grupos variou de três a 800 indivíduos, muitas vezes acompanhados de filhotes. Os registros aconteceram majoritariamente na área do talude continental, com poucos registros sob maiores profundidades da plataforma continental (**Figura II.4.13-2**).

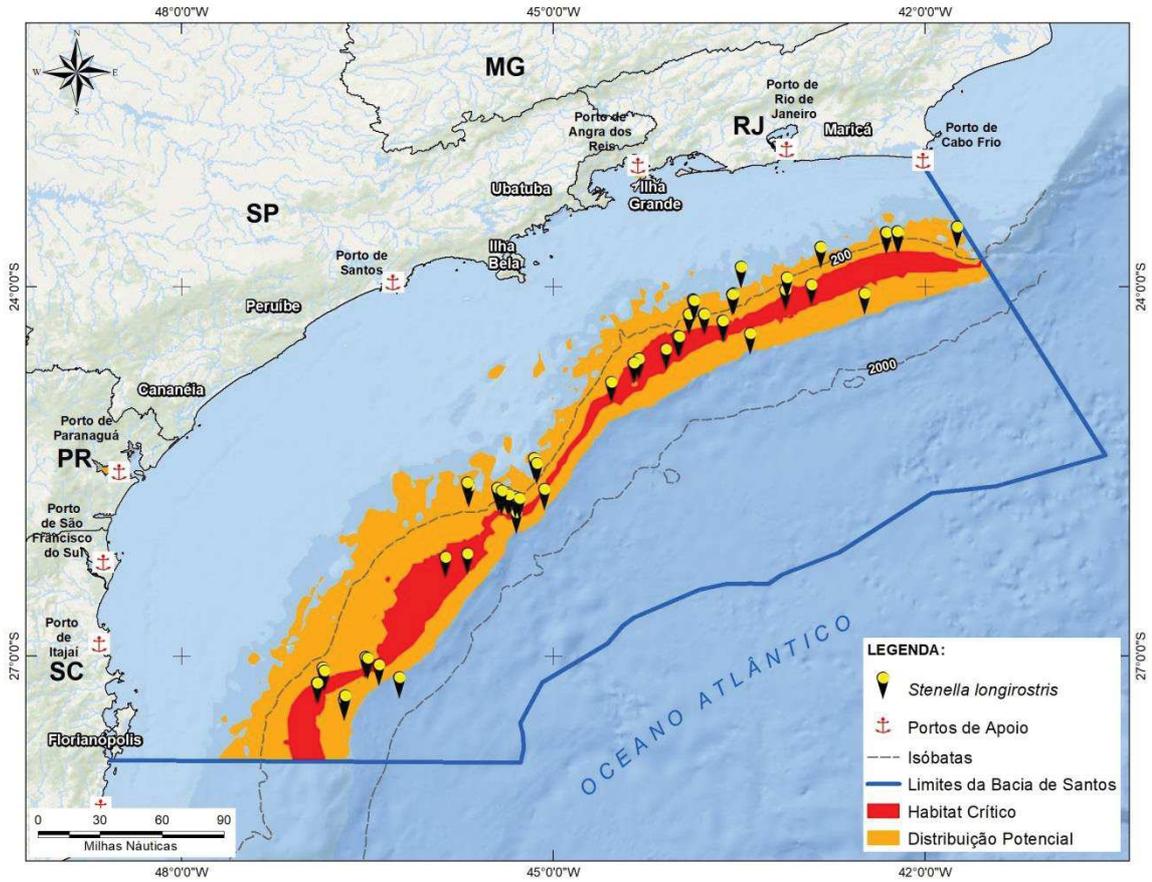


Figura II.4.13-2: Localização dos registros de *Stenella longirostris* durante o PMC-BS.

II.4.14 Golfinho-de-Clymene (*Stenella clymene*)

Quadro II.4.14-1: Descrição do golfinho-de-Clymene, *Stenella clymene*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-de-clymene, <i>Stenella clymene</i> Gray, 1850	
Tamanho adulto: até 2 metros	Peso adulto: até 90 kg
Tamanho filhote: até 1,1 metro	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico.	
Caracteres diagnósticos: menor que a maioria dos golfinhos oceânicos, mas com o corpo mais robusto; o rostro é cinza-claro com a extremidade e os lábios pretos; região dorsal na cor cinza-escura, formando uma capa em forma de V logo abaixo da dorsal; flanco cinza-claro e ventre branco; possui uma listra preta na parte superior do rostro em direção aos lábios; nadadeira dorsal falcada e estreita.	
Comportamento: comportamento aéreo muito ativo, nadam junto a proa de embarcações (<i>bow-riding</i>); podem saltar e girar em torno do eixo, como o golfinho-rotador.	
Uso de habitat: águas oceânicas, com profundidade média em torno de 1.800 metros de profundidade.	
Tamanho de grupo: comumente observados em grupos com tamanho médio de 70 indivíduos; grupos com até centenas de indivíduos podem ser observados ocasionalmente.	
Status IUCN (2018): Deficiente em Dados	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-de-Clymene possui um padrão tripartido de coloração. O dorso é coberto por cinza-escuro, com a lateral cinza-clara e o ventre branco. A camada cinza-escura se estende em forma de V, logo abaixo da dorsal. O rostro é moderadamente curto e marcado por uma listra preta na extremidade superior, como um “bigode”. Sua coloração é cinza-clara, com a extremidade e os lábios pretos. Uma listra cinza-escura se estende do olho até a inserção da nadadeira peitoral. Machos e fêmeas podem atingir o comprimento máximo de até 2 metros (JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. Sem uma visualização clara da coloração, podem ser confundidos com outros delfínídeos, especialmente os do gênero *Stenella*. São similares ao golfinho-rotador (*Stenella longirostris*), mas são menores, mais robustos, e possuem o rostro mais curto. Visualizar o “bigode” do rostro também pode ajudar a confirmar a identificação.

Distribuição. É uma espécie oceânica. Ocorre em águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico, incluindo o Caribe e o Golfo do México. Preferem águas quentes, com até 4.500 metros de profundidade (JEFFERSON et al., 2015; AMARAL et al., 2015), e média de 1.870 metros. No Brasil, foi registrada a ocorrência da espécie nas regiões Sul (SIMÕES-LOPES et al., 1994; FERTL et al., 2003) e Nordeste (BATISTA et al., 2012). Modelos apontam para uma alta probabilidade de ocorrência nestas áreas, em águas quentes e profundas, com mais de 1.000 metros de profundidade (MORENO et al., 2005; AMARAL et al., 2015).

População. A abundância foi estimada apenas para o norte do Golfo do México e costa leste dos EUA, com valores de 6.575 (CV = 36%) e 6.086 (CV = 93%), respectivamente (WARING et al., 2008). Considerando a dificuldade em diferenciar esta espécie de outras do mesmo gênero, acredita-se que não seja tão rara como parece (PERRIN & MEAD, 1994).

Comportamento. São observados em grupos com tamanho médio de 70 indivíduos, embora agregações com mais de 1.000 indivíduos já tenham sido registradas (REEVES et al., 2002; FERTL et al., 2003). Nadam junto às embarcações (*bow-riding*) e outros cetáceos. São ágeis e saltam com frequência, exibindo um comportamento aéreo semelhante ao do golfinho-rotador (*Stenella longirostris*), girando em torno do eixo (LODI & BOROBIA, 2013). Aparentemente, se alimentam de pequenos peixes e cefalópodes (JEFFERSON et al., 2015), fazendo pesca cooperativa. Há evidências de que se alimentem à noite, capturando peixes mesopelágicos.



Figura II.4.14-1: Golfinho-de-Clymene (*Stenella clymene*) observado durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, houve oito registros para golfinho-de-Clymene, sendo um no primeiro ano, três no segundo e quatro no terceiro. Os grupos variaram de 8 a 700 indivíduos, por vezes acompanhados de filhote. A distribuição dos registros se deu entre o talude continental e a região oceânica (Figura II.4.14-2).

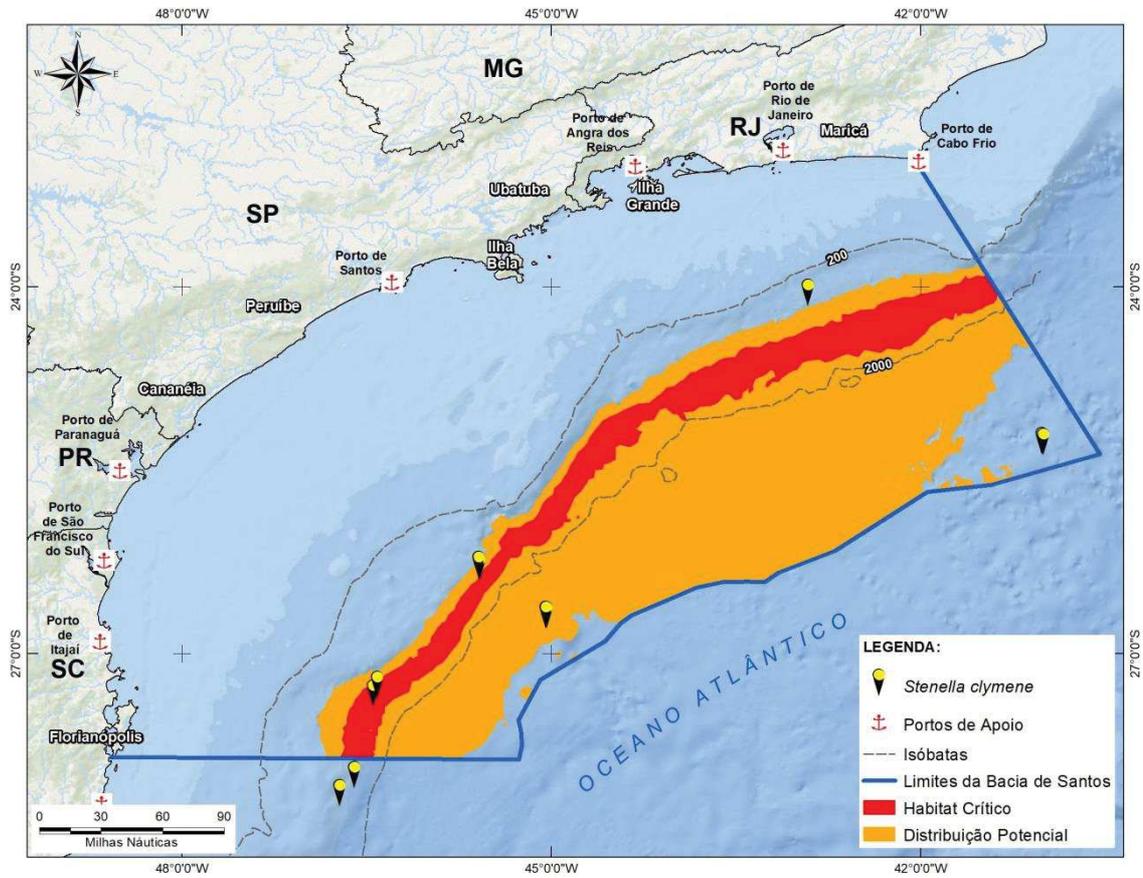


Figura II.4.14-2: Localização dos registros de *Stenella clymene* durante o PMC-BS.

II.4.15 Golfinho-comum (*Delphinus delphis*)

Quadro II.4.15-1: Descrição do golfinho-comum, *Delphinus delphis*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-comum, <i>Delphinus delphis</i> Linnaeus, 1758	
Tamanho adulto: até 2,7 metros	Peso adulto: até 200 kg
Tamanho filhote: cerca de 1 m	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Amplamente distribuídos em todos os oceanos, exceto regiões polares.	
Caracteres diagnósticos: padrão de coloração formado por duas linhas principais que se cruzam em forma de “X” e compõem quatro regiões distintas: dorso cinza-escuro a preto, ventre branco, mancha torácica com tons amarelos, região posterior do flanco em tons cinza-claro; nadadeira dorsal alta e triangular.	
Comportamento: grupos grandes e ativos, vistos frequentemente quando se deslocam em alta velocidade; excelentes acrobatas, com saltos sincronizados entre os indivíduos de um grupo; altamente vocais, produzindo sons audíveis acima da superfície da água; costumam nadar na proa de embarcações; carregam ou empurram objetos que flutuam na superfície.	
Uso de habitat: associados a áreas de alta produtividade, com estoques de habito costeiro e oceânico.	
Tamanho de grupo: grupos de 1 a 30 indivíduos, podendo chegar a 250 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Menor preocupação	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-comum caracteriza-se por um padrão de coloração típico, formado por duas linhas principais que se cruzam em forma de “X” e compõem quatro regiões principais distintas: dorso cinza-escuro a preto, ventre branco, mancha torácica com grande variação de tons amarelos, região posterior do flanco em tons cinza-claro. Em vista lateral, há 4 listras características. A nadadeira dorsal é alta e em formato triangular, posicionada no centro do dorso. Outro caráter diagnóstico importante é a presença de um par de

sulcos ventrais profundos no palato (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015).

Espécies similares. Alguns golfinhos do gênero *Stenella* se parecem com o golfinho-comum e confundem o observador. Contudo, o singular padrão de coloração torna a espécie evidente sob um olhar mais atento, especialmente o padrão em “X” ou “V” da coloração nos flancos abaixo da dorsal do golfinho-comum. Podem ajudar na distinção também os tons amarelados da coloração de *Delphinus* spp., embora isto não seja uma característica diagnóstica da espécie *per se*.

Distribuição. Amplamente distribuídos em todos os oceanos, exceto regiões polares (LODI & BOROBIA, 2013). No litoral brasileiro, os golfinhos-comuns estão associados a áreas de alta produtividade. Há três estoques populacionais, distribuídos nas regiões Norte, Sudeste e Sul do Brasil, porém o gênero parece estar ausente na região Nordeste (TAVARES et al., 2010). Há duas regiões de maior ocorrência no litoral brasileiro, uma na região Sul, ao longo da isóbata dos 100 m (TAVARES et al., 2010), e outra na região Sudeste, principalmente na localidade de Arraial do Cabo, onde os animais são facilmente avistados na costa.

População. A espécie pode ser considerada abundante, com diversas estimativas para áreas do Oceano Pacífico oriental, costa oeste dos Estados Unidos e Atlântico Norte. Apesar de abundante, há uma deficiência grande de informações sobre a espécie para o Oceano Atlântico Sul, onde não existem estimativas populacionais realizadas até o momento.

Comportamento. Avistados em grupos de 1 a 30 indivíduos, podem formar grupos com até 250 indivíduos. É comum ver os animais bastante ativos se deslocando em alta velocidade. Realizam saltos sincronizados entre os indivíduos de um grupo ou solitariamente. São altamente vocais, produzindo sons audíveis acima da superfície da água. Costumam nadar junto a proa de embarcações. Carregam ou empurram objetos que flutuam na superfície.



Figura II.4.15-1: Grupos do golfinho-comum (*Delphinus delphis*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. O golfinho-comum foi registrado sete vezes durante os três primeiros anos de PMC-BS, com a presença ocasional de filhote entre os membros. Os grupos variaram de 6 a 60 indivíduos. A distribuição se deu principalmente em regiões próximas da costa, nas proximidades do Rio de Janeiro-RJ e Santos-SP, com exceção de um grupo que foi registrado no talude, na latitude de Florianópolis-SC. Por meio de análise genética, foi possível identificar um indivíduo em nível de espécie, classificado como *Delphinus delphis*. Este indivíduo estava próximo à Ilhabela-SP (**Figura II.4.15-2**).

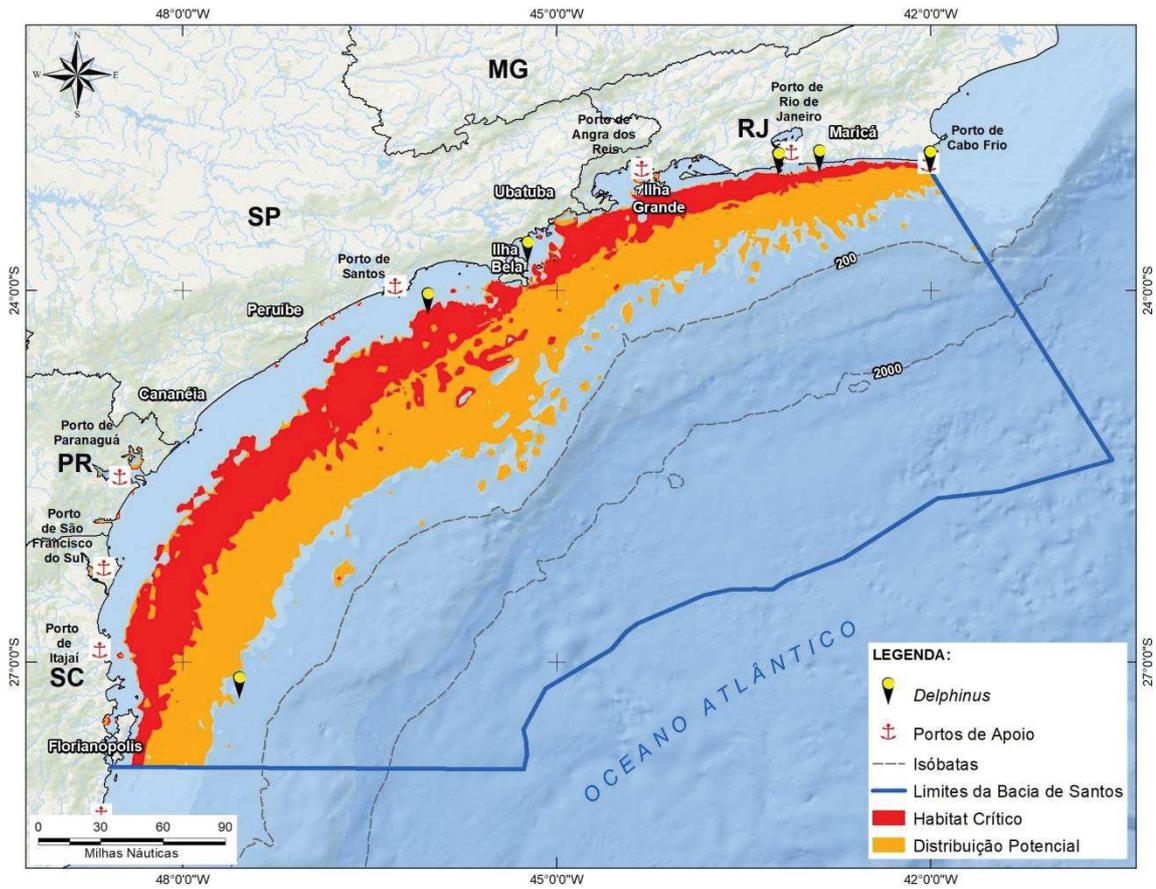


Figura II.4.15-2: Localização dos registros do gênero *Delphinus* durante o PMC-BS.

II.4.16 Golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*)

Quadro II.4.16-1: Descrição do golfinho-de-Fraser, *Lagenodelphis hosei*.

Subordem Odontoceti	Família Delphinidae
Golfinho-de-Fraser, <i>Lagenodelphis hosei</i> Fraser, 1956	
Tamanho adulto: até 2,6 metros (fêmeas) e até 2,7 metros (machos)	Peso adulto: até 210 kg (machos)
Tamanho filhote: até 1,9 metros	Peso filhote: sem informação na literatura
Distribuição: Águas tropicais, subtropicais e temperadas de todos os oceanos, entre 30°N e 30°S.	
Caracteres diagnósticos: espécie distinta pelo corpo robusto e apêndices desproporcionalmente pequenos; rostró é curto, porém bem definido; coloração com uma listra negra lateral, que vai da região da cabeça até o ânus; a listra negra menor passa pela região da mandíbula inferior até a nadadeira peitoral; listras raramente são aparentes nos jovens; o dorso é cinza-escuro com as laterais cinza-claras ou creme; o ventre é branco, mas pode apresentar uma tonalidade rosada; os machos apresentam uma protuberância pós-anal bem definida, que é ausente ou pouco definida nas fêmeas; a nadadeira dorsal é pequena e triangular, ou levemente falcada, posicionada no centro do corpo, tendendo a ser mais ereta nos machos.	
Comportamento: frequentemente se associam com outras espécies de cetáceos; nadadores ativos e os grupos se deslocam em grande velocidade, rompendo a superfície em ângulos baixos (<i>porpoising</i>), formando uma vasta espuma branca; podem aproximar-se de embarcações e nadar junto a proa, mas também podem ser mais tímidos e de difícil aproximação dependendo da região; costumam formar grupos mistos com outras espécies de cetáceos.	
Uso de habitat: áreas oceânicas profundas, mas podem ocorrer em áreas mais próximas da plataforma, nos locais onde a plataforma continental é mais estreita ou que tenham ressurgência.	
Tamanho de grupo: tende a formar grandes grupos de 100 a mais de 1.000 indivíduos.	
Status IUCN (2018): Baixo Risco	Status MMA (2014): Deficiente em Dados

Características. O golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*) foi descrito em 1956 através do esqueleto, no entanto, foi avistado na natureza apenas em 1971. É um golfinho bem distinto das outras espécies por apresentar um corpo robusto

(tamanho máximo de 2,7 metros) e os apêndices (nadadeira dorsal, peitoral e caudal) proporcionalmente pequenos. O rostro é largo e curto, comparado aos outros golfinhos tropicais, porém visível e bem definido. A coloração é bem característica, com uma listra negra na região lateral, passando pelos olhos até a região do ânus. Outra listra negra menor sai da mandíbula inferior até a nadadeira peitoral. Há bastante variação entre os sexos e faixas etárias. Nas fêmeas, a listra negra é mais tênue e pode estar até ausente nos animais mais jovens. No macho, as listras negras tendem a escurecer com a idade e até fundir-se, formando o que é informalmente conhecido como “máscara de bandido”. O dorso é cinza-escuro e o flanco cinza-claro. A região ventral é branca, podendo apresentar uma coloração rosada. A nadadeira dorsal, localizada no centro do corpo, é triangular ou levemente falcada nos jovens e fêmeas, tendendo a ser mais ereta nos machos. A nadadeira peitoral é pequena e pontiaguda. Uma protuberância pós-anal pode ser observada nos machos, sendo pouco desenvolvida nas fêmeas.

Espécies similares. Quando observado de perto, o golfinho-de-Fraser é bem distinto das outras espécies. Quando observado a maiores distâncias, pode ser confundido com o golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) devido ao corpo robusto e à listra lateral escura. Mas a morfologia da cabeça e do rostro possibilitam sua identificação. É a única espécie de golfinho de pequeno porte com o rostro mais curto, comparado às outras espécies oceânicas.

Distribuição. Os golfinhos-de-Fraser são encontrados em águas tropicais, subtropicais e temperadas quentes (entre 30°N - 30°S) de todos os oceanos. Ocorrem em águas oceânicas profundas, mas podem aproximar-se de águas mais rasas em locais onde a plataforma é mais estreita (LODI & BOROBIA, 2013). No Brasil, os registros conhecidos são principalmente de encalhes em regiões tropicais a temperadas (DI BENEDITTO et al., 2001; PINEDO et al., 2001; MORENO et al., 2003; TOSI et al., 2009)

População. A espécie parece não ser abundante em nenhuma localidade (talvez apenas em algumas áreas das Filipinas) (JEFFERSON et al., 2015). No Brasil, é considerada de ocorrência ocasional (MORENO et al., 2003; LODI & BOROBIA, 2013), mas não existem estimativas de abundância para a espécie. Devido à abrangência geográfica em águas oceânicas, não é considerada ameaçada (IUCN, 2018).

Comportamento. Podem nadar ativamente em velocidade com saltos em ângulos baixos (*porpoising*), formando bastante espuma. Os grupos geralmente são grandes e frequentemente se associam com outras espécies, especialmente

o golfinho-cabeça-de-melão em regiões do Pacífico e nas Filipinas (JEFFERSON et al., 2015). Os grupos são formados por indivíduos de ambos os sexos e classes de idade, mas pouco se sabe sobre a estrutura social. Existem registros de encalhes em massa, inclusive no Brasil (LODI & BOROBIA, 2013). A dieta parece ser constituída de peixes da coluna da água, lulas e crustáceos. Podem mergulhar a profundidades de até 600 m, mas já foram observados forrageando na superfície. Pouco se sabe sobre a ecologia e comportamento do golfinho-de-Fraser (JEFFERSON et al., 2015).



Figura II.4.16-1: Grupos de golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*) observados na Bacia de Santos.

Registros no PMC-BS. No PMC, foi feito um único registro da espécie em águas oceânicas (acima de 2.000 m), ao largo da Baía da Ilha Grande (RJ). O golfinho-de-Fraser foi avistado em um grupo misto, com dezenas de indivíduos da

espécie associados com um grupo grande (mais de 100 indivíduos) do golfinho-cabeça-de-melão.

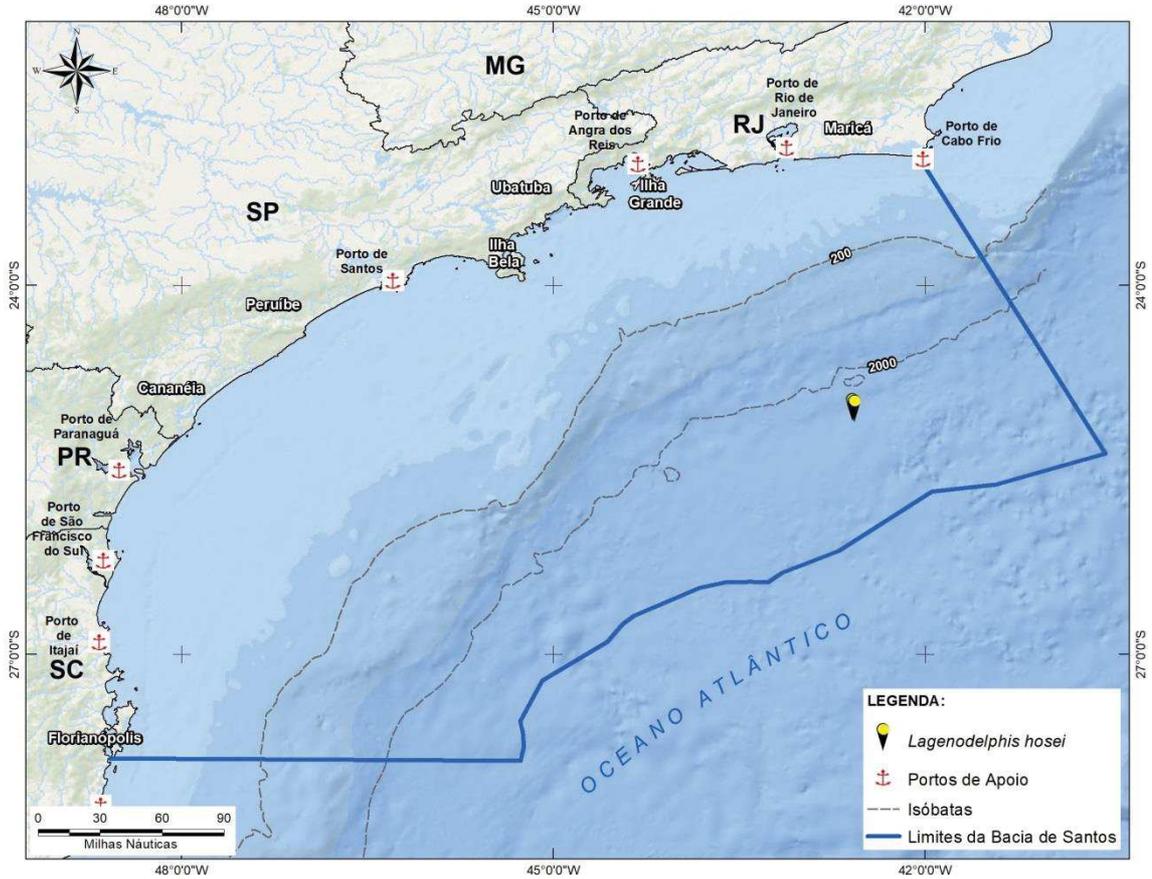


Figura II.4.16-2: Localização do registro de *Lagenodelphis hosei* durante campanha do PMC-BS.

II.5 Família Pontoporidae

Esta família inclui uma única espécie atual, a toninha (*Pontoporia blainvillei*). Anteriormente agrupada com os golfinhos de rio (Lipotidae e Iniidae), formava uma única família, a Platanistidae, dentro da superfamília Platanistoidea. Embora a sistemática do grupo ainda esteja em discussão, a composição mais aceita atualmente é de que existam quatro famílias (Pontoporiidae, Platanistidae, Iniidae e Lipotidae), considerando que os caracteres compartilhados entre as espécies da antiga família Platanistidae (rosto alongado e sínfise mandibular) são caracteres ancestrais convergentes. Pontoporiidae é a única família do antigo grupo a viver unicamente em ambiente marinho, com hábitos costeiros, adentrando ocasionalmente em ambientes estuarinos. Além do rosto alongado, a nadadeira dorsal pequena e arredondada, as nadadeiras peitorais em forma de espátula e os olhos pequenos são características marcantes da família (LODI & BOROBIA, 2013).

II.5.1 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Quadro II.5.1-1: Descrição da toninha, *Pontoporia blainvillei*.

Subordem Odontoceti	Família Pontoporiidae
Toninha, <i>Pontoporia blainvillei</i> Gervais & d'Orbigny, 1844	
Tamanho adulto: 1,8 m (♀) e 1,6 m (♂)	Peso adulto: 33 a 55 kg
Tamanho filhote: 55 a 80 cm	Peso filhote: 5 a 7 kg
Distribuição: Águas costeiras do leste da América do Sul, desde o Espírito Santo (18°S), no Brasil, até Chubut (42°S), na Argentina.	
Caracteres diagnósticos: uma das menores espécies de odontoceto; rosto fino e extremamente longo; nadadeira dorsal baixa triangular ou levemente falcada; nadadeira peitoral larga e espatulada; coloração marrom-acinzentada;	
Comportamento: emersão para respiração é discreta; comportamento de emersão característico, exibindo primeiramente o rosto longo apontado ligeiramente para cima; evitam aproximação de embarcações e não realizam <i>bow-riding</i> ; comportamentos aéreos são extremamente raros; deslocam-se com movimentos suaves e tranquilos; não realizam migrações.	
Uso de habitat: áreas costeiras abertas, predominantemente até a isóbata de 30 metros, mas podendo chegar até os 50 metros.	
Tamanho de grupo: solitários ou grupos de 2 a 5 indivíduos, podendo formar agrupamentos com mais de 10 indivíduos durante o comportamento de pesca.	
Status IUCN (2018): Vulnerável	Status MMA (2014): Criticamente ameaçada

Características. A toninha (*Pontoporia blainvillei*) é uma das menores espécies de odontoceto. Uma característica marcante da espécie é o seu rosto fino e extremamente longo, considerado o maior entre os cetáceos em proporção ao tamanho do corpo (12-15% do comprimento total em adultos), sendo mais longo nas fêmeas (17-22 cm) que nos machos (15-19 cm) (JEFFERSON et al., 2015). A nadadeira dorsal é relativamente pequena, triangular ou levemente falcada, e a nadadeira peitoral é larga e espatulada (LODI & BOROBIA, 2013; JEFFERSON et al., 2015). Sua coloração marrom-acinzentada se confunde com as águas de alta turbidez dos ambientes onde vive.

Espécies similares. A toninha pode ser confundida com o boto-cinza (*Sotalia guianensis*) se for vista a distância, mas o longo rosto dos adultos, a nadadeira

dorsal pequena e triangular, a coloração mais amarronzada e a nadadeira peitoral espatulada identificam facilmente a espécie.

Distribuição. A toninha é uma espécie endêmica do Oceano Atlântico Sul Ocidental, com distribuição restrita à costa leste da América do Sul, desde o Espírito Santo (18°S), no Brasil, até Chubut (42°S), na Argentina. Porém, sua distribuição não é contínua, com dois hiatos: o primeiro entre o litoral central do Espírito Santo (19°S) e o norte do Rio de Janeiro (21°S), e o segundo entre o litoral central do Rio de Janeiro (22°) e o norte de São Paulo (23°) (SICILIANO et al., 2002). Ocorre principalmente em áreas costeiras abertas, predominantemente até a isóbata de 30 metros, mas pode ser avistada até os 50 metros. Adentra ocasionalmente em baías e estuários, com exceção da Baía da Babitonga (Santa Catarina), onde há uma população residente o ano todo (CREMER & SIMÕES-LOPES, 2005; DANILEWICZ et al., 2009).

População. Cinco estoques populacionais são reconhecidos com base em estudos genéticos (*Franciscana Management Areas*): a primeira inclui toninhas da Argentina, do Uruguai e do Estado do Rio Grande do Sul; a segunda reúne as toninhas dos estados de Santa Catarina, Paraná e litoral central e sul de São Paulo; a terceira inclui as toninhas do norte de São Paulo; por fim, a quarta e a quinta população são consideradas as mais divergentes geneticamente, sendo isoladas pelos hiatos, sendo uma no norte do Rio de Janeiro e a outra no norte do Espírito Santo (CUNHA et al., 2014). A Baía de Babitonga abriga a única população conhecida da espécie que reside o ano todo em ambiente estuarino e possui condições ambientais consideradas propícias para o avistamento da espécie, com águas calmas e protegidas (CREMER & SIMÕES-LOPES, 2005).

Com distribuição predominante em águas de até 30 metros de profundidade, é especialmente vulnerável à captura incidental (SECCHI & OTT, 2000). Este cenário faz com que a toninha seja considerada o golfinho mais ameaçado do Oceano Atlântico Sul Ocidental (PRADERI et al., 1989). Recentemente passou a ser considerada em estado crítico de extinção no Brasil (MMA, 2014).

Comportamento. Quando a toninha vem à superfície para respirar, exhibe o rosto longo apontado ligeiramente para cima (45° em relação à superfície da água), a cabeça, parte do dorso e, algumas vezes, a nadadeira dorsal. Contudo,

sua emergência é muito discreta. Desloca-se com movimentos suaves e tranquilos. Seu comportamento pode ser influenciado pelas condições de maré e profundidade (BORDINO, 2002). Os comportamentos aéreos são extremamente raros e, em geral, evitam aproximação de embarcações e não realizam *bow-riding* (WELLS et al., 2013). De acordo com CREMER & SIMÕES-LOPES (2005), sua coloração críptica, tamanho pequeno e comportamento discreto dificultam seu avistamento.

Muito pouco se conhece sobre o repertório acústico da toninha. Na Argentina, MELCÓN et al. (2012) descreveram de forma preliminar os sons de ecolocalização da espécie, demonstrando que a toninha produz sons pulsados em alta frequência e de banda estreita (*narrow-band high frequency*), semelhante aos golfinhos dos gêneros *Phocoena* e *Cephalorhynchus*. Possivelmente os sons do tipo *burst-pulse* possuem importante função de comunicação para a espécie, uma vez que mesmo filhotes com menos de uma semana de vida são acusticamente ativos, produzindo sons desta natureza (TELLECHEA & NORBIS, 2014).



Figura II.5.1-1: Toninhas (*Pontoporia blainvillei*) observadas na Baía de Babitonga, durante o PMC-BS.

Registros no PMC-BS. Durante o PMC-BS, a toninha foi registrada em 10 ocasiões. Estavam sempre em grupos pequenos, de três ou quatro indivíduos. Somente um filhote foi registrado em um grupo de quatro indivíduos, no primeiro ano. Todos os registros foram feitos próximo à costa (**Figura II.5.1-2**).

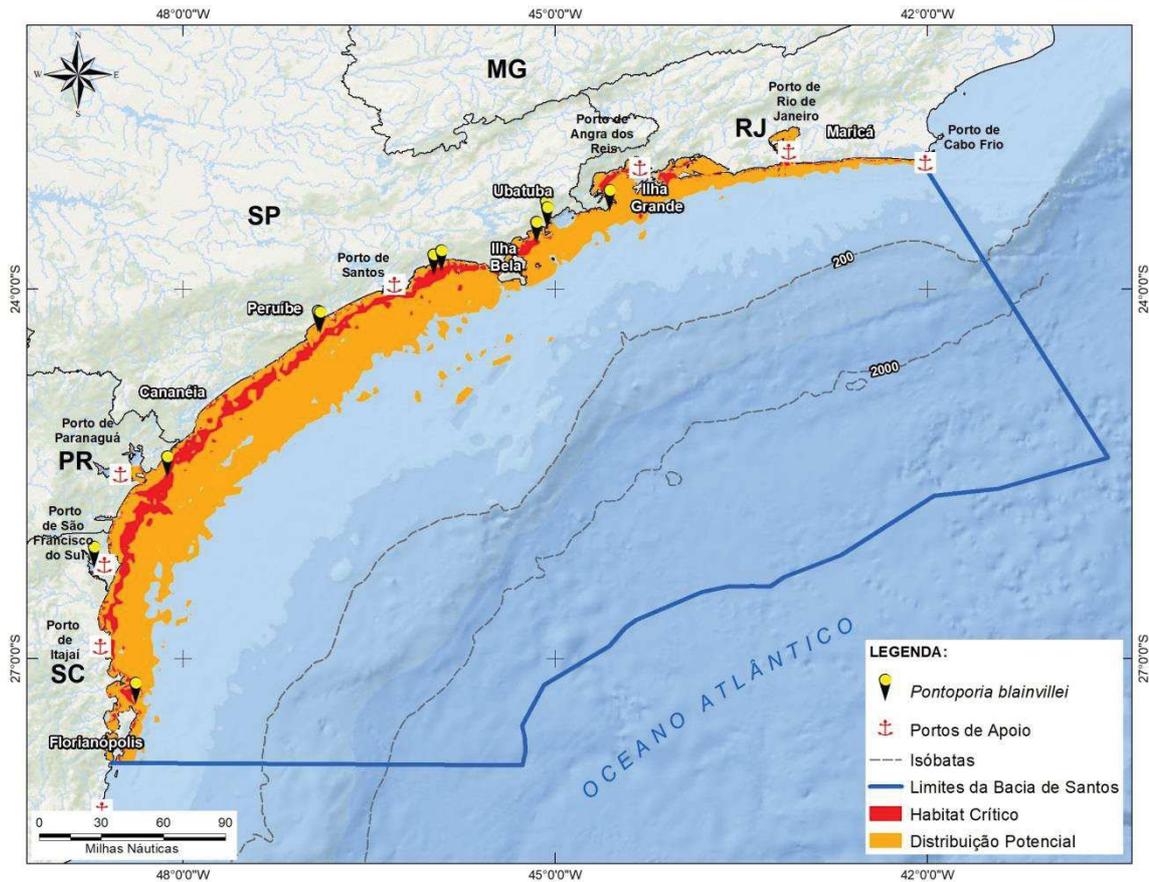


Figura II.5.1-2: Localização dos registros de *Pontoporia blainvillei* durante o PMC-BS.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-SOTO, N., JOHNSON, M.P., MADSEN, P.T., DÍAZ, F., DOMÍNGUEZ, I., BRITO, A. & TYACK, P. 2008. Cheetahs of the deep sea: deep foraging sprints in short-finned pilot whales off Tenerife (Canary Islands). **Journal of Animal Ecology**, 77(5): 936-947.
- AMARAL, K.B., ALVARES, D.J., HEINZELMANN, L., BORGES-MARTINS, M., SICILIANO, S. & MORENO, I.B. 2015. Ecological niche modeling of *Stenella dolphins* (Cetartiodactyla: Delphinidae) in the southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 472: 166-179.
- ANDRIOLO, A., DA ROCHA, J.M., ZERBINI, A.N., SIMÕES-LOPES, P.C., MORENO, I.B., LUCENA, A., DANILEWICZ, D. & BASSOI, M. 2010a. Distribution and relative abundance of large whales in a former whaling ground off eastern South America. **Zoologia**, 27(5): 741-750.
- ANDRIOLO, A., KINAS, P.G., ENGEL, M.H. & MARTINS, C.C.A. 2010b. Humpback whale population estimates and distribution along the Brazilian breeding ground. **Endangered Species Research**, 11:233-243.
- ANDRIOLO, A., REIS, S.S., AMORIM, T.O., SUCUNZA, F., DE CASTRO, F.R., MAIA, Y. G. & DALLA ROSA, L. 2015. Killer whale (*Orcinus orca*) whistles from the western South Atlantic Ocean include high frequency signals. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 138(3): 1696-1701.
- ANTONELLI, H.H., LODI, L. & BOROBIA, M. 1987. Avistagens de cetáceos no período de 1980 a 1985 no litoral da Paraíba, Brasil. **Segunda Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**, 4-8 Ago., 1986, Rio de Janeiro, pp. 114.
- AZEVEDO, A.F., CARVALHO, R.R., KAJIN, M., VAN SLUYS, M., BISI, T.L. & LAÍLSON-BRITO, J.JR. 2017. The first confirmed decline of a delphinid population from Brazilian Waters: 2000-2015 abundance of *Sotalia guianensis* in Guanabara Bay, South-eastern Brazil. **Ecological Indicators**, 79: 1-10.
- BARACHO, C.G., MÁZ-ROSA, S. & MARCOVALDI, E. 2002. Primeiro registro de baleia-franca-do-sul (*Eubalaena australis*) no litoral norte da Bahia. **Abstracts**

of 10ª Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América Del Sur, Valdívía.

- BATISTA, R.L.G., SCHIAVETTI, A., SANTOS, U.A.D. & REIS, M.D.S.S.D. 2012. Cetaceans registered on the coast of Ilhéus (Bahia), northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, 12(1), 31-38.
- BERTA, A., SUMICH, J.L. & KOVACS, K. 2015. **Marine Mammals: evolutionary biology**. 3 ed. Academic Press, Amsterdam.
- BLOODWORTH, B.E. & ODELL, D.K. 2008. *Kogia breviceps* (Cetacea: kogiidae). **Mammalian Species**, 239: 1-12.
- BORDINO, P. 2002. Movement pattern of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in Bahia Anegada, Argentina. **Latin American Journal of Aquatic Mammals** 1(1): 71-76.
- BRANCH, T.A., STAFFORD, K.M., PALACIOS, D.M., ALLISON, C., BANNISTER, J.L., BURTON, C.L.K. 2007. Past and present distribution, densities and movements of blue whales *Balaenoptera musculus* in the Southern Hemisphere and northern Indian Ocean. **Mammal Review**, 37(2): 116-175.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2014. Portaria No. 444, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, 245 (Seção 1): 121-126.
- BRODIE, P.F. 1975. Cetacean energetics, and overview of intraspecific size variation. **Ecology**, 56:152-161.
- CABALLERO S., SANTOS M.C.O., SANCHES A., ANTONIO A. & MIGNUCCI-GIANNONI A.A. 2013. Initial description of the phylogeography, population structure and genetic diversity of Atlantic spotted dolphins from Brazil and the Caribbean, inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, 48: 263–270.
- CANTOR, M., WEDEKIN, L.L., DAURA-JORGE, F.G., ROSSI-SANTOS, M.R. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2012. Assessing population parameters and trends of guiana dolphins (*Sotalia guianensis*): An eight-year mark-recapture study. **Marine Mammal Science**, 28(1): 41-60.
- CARRETTA, J.V., FORNEY, K.A., MUTO, M.M., BARLOW, J., BAKER, J., HANSON, B. & LOWRY, M.S., 2006. U.S. Pacific marine mammal stock assessments. **NOAA Technical Memorandum NMFS**, Jan 2007, p. 169.

- CARWARDINE, M. 2002. **Whales, dolphins and porpoises**. London: Fog City Press,
- CLAPHAM, P.J. 1994. Maturational changes in patterns of association in male and female humpback whales, *Megaptera novaeangliae*. **Journal of Zoology of London**, 234: 265-274.
- COCKCROFT, V.G., HASCHICK, S.L. & KLAGES, N.T.W. 1993. The diet of Risso's dolphin, *Grampus griseus* (Cuvier, 1812), from the east coast of South Africa. **Zeitschrift für Säugetierkunde**, 58(5): 286-293.
- COSTA, A.P.B., FRUET, P., DAURA-JORGE, F.G., SIMÕES-LOPES, P.C., OTT, P.H., VALIATI, V.H. & DE OLIVEIRA, L.R. 2015. Bottlenose dolphin communities from the southern Brazilian coast: do they exchange genes or are they just neighbours? **Marine and Freshwater Research**, 66(12), 1201-1210.
- CRANFORD, T.W., AMUNDIN M. & NORRIS. K.S. 1996. Functional morphology and homology in the odontocete nasal complex: implications for sound generation. **Journal of Morphology**, 228: 223-285.
- CREMER, M.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2005. The occurrence of *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny) (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine area in southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22:717-723.
- CREMER, M.J. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2008. Distribution, abundance and density estimates of franciscanas, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), in Babitonga bay, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 25: 397-402.
- CUNHA, H. A., MEDEIROS, B. V., BARBOSA, L. A., CREMER, M. J., MARIGO, J. & LAÍLSON-BRITO, J. 2014. Population Structure of the Endangered Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing Management Units. **PLoS ONE** 9(1): e85633. doi: 10.1371/journal.pone.0085633.
- CYPRIANO-SOUZA, A.L., FERNÁNDEZ, G.P., LIMA-ROSA, C.A.V., ENGEL, M.H. & BONATTO, S.L. 2010. Microsatellite genetic characterization of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) Breeding Ground off Brazil (Breeding Stock A). **Journal of Heredity**, 101(2):189-200.
- DALLA-ROSA, L., SECCHI, E.R., BRITO JR., J.L. & AZEVEDO, A.F. 2002. A review of killer whales (*Orcinus orca*) in Brazilian waters. in: **Proceedings of**

- International Orca Symposium and Workshop (Villiers en Bois, France)**, pp. 46–49.
- DALLA-ROSA, L. & SECCHI, E.R. 1997. Stranding of a Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) in Southern Brazil: 'True' or Pygmy? **Report of the International Whaling Commission**, 47: 425-429.
- DALLA-ROSA, L. & SECCHI, E.R. 2007. Killer whale (*Orcinus orca*) interactions with the tuna and swordfish longline fishery off southern and south-eastern Brazil: A comparison with shark interactions. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 87, 135–140.
- DANILEWICZ, D., SECCHI, E. R., OTT, P. H., MORENO, I. B., BASSOI, M. & BORGES-MARTINS, M. 2009. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 89, p. 943.
- DANILEWICZ, D., OTT P.H., SECCHI E., ANDRIOLO A. & ZERBINI A. 2013. Occurrence of the Atlantic spotted dolphin, *Stenella frontalis*, in southern Abrolhos Bank, Brazil. **Marine Biodiversity Records** 6: e6.
- DARLING, J. D., JONES, M. E. & NICKLIN, C. P. 2006. Humpback whale songs: Do they organize males during the breeding season. **Behaviour**, 143 (9), 1051–1101.
- DAURA-JORGE, F.G., INGRAM, S.N. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2013. Seasonal abundance and adult survival of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a community that cooperatively forages with fishermen in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, 29(2), 293-311.
- DAWBIN, W. 1966. The seasonal migratory cycle of the humpback whale. In: **Whales, Dolphins and Porpoises**. (ed. Norris, K.S.), pp. 145-170. Berkeley: University of California Press.
- DEMÉRÉ, T. A., BERTA, A. & MCGOWEN, M. R. 2005. The taxonomic and evolutionary history of fossil and modern balaenopteroid mysticetes. **Journal of Mammalian Evolution**, 12: 99-143.
- DI BENEDETTO, A.P.M., RAMOS, R.M.A., SICILIANO, S., SANTOS, R.A., BASTOS, G. & FAGUNDES-NETTO, E. 2001. Stomach contents of delphinids from Rio de Janeiro, southeastern Brazil. **Aquatic Mammals**, 27(1):24-28.

- DI TULLIO, J.C., GANDRA, T.B.R., ZERBINI, A. & SECCHI, E.R. 2016. Diversity and distribution patterns of cetaceans in the subtropical southwestern Atlantic outer continental shelf and slope. **PLoS ONE**, 11(5): e0155841. doi:10.1371/journal.pone.0155841
- ENGEL, M.H., FAGUNDES, N.J.R., ROSENBAUM, H.C., LESLIE, M.S., OTT, P.H., SCHMITT, R., SECCHI, E., DALLA ROSA, L. & BONATTO, S.L. 2008. Mitochondrial DNA diversity of the Southwestern Atlantic humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding area off Brazil, and the potential connections to Antarctic feeding areas. **Conservation Genetics**, 9: 1253-1262.
- ENGEL, M.H. & MARTIN, A.R. 2009. Feeding grounds of the western South Atlantic humpback whale population. **Marine Mammal Science**, 25: 964–969.
- FERTL, D., JEFFERSON, T.A., MORENO, I.B., ZERBINI, A.N. & MULLIN, K.D. 2003. Distribution of the Clymene dolphin *Stenella clymene*. **Mammal Review**, 33(3-4), 253-271.
- FLACH, L., FLACH, P. A. & CHIARELLO, A. G. 2008. Aspects of behavioral ecology of *Sotalia guianensis* in Sepetiba Bay, southeast Brazil. **Marine Mammal Science**, 24: 503–515. doi:10.1111/j.1748-7692.2008.00198.
- FORNEY, K.A. & WADE, P.R. 2006. Worldwide Distribution and Abundance of Killer Whales. In: **Whales, Whaling, and Ocean Ecosystems** (Eds.: ESTES, J.E., DEMASTER, D.P., DOAK, D.F., WILLIAMS, T.M. & BROWNELL JR., R.L.), pp. 145-162. Berkeley: University of California Press.
- FREITAS, A.C., KINAS, P.G., MARTINS, C.C.A. & ENGEL, M.H. 2004. Abundance of humpback whales on the Abrolhos Bank wintering ground, Brazil. **Journal of Cetacean Research and Management**, 3: 225-230.
- FRUET, P.F., DAURA-JORGE, F.G., MÖLLER, L.M., GENOVES, R.C. & SECCHI, E.R. 2015. Abundance and demography of bottlenose dolphins inhabiting a subtropical estuary in the Southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Mammalogy**, 96(2), 332-343.
- GEDAMKE, J., COSTA, D.P. & DUNSTAN, A. 2001. Localization and visual verification of a complex minke whale vocalization. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 109(6): 3038-3047.

- GONÇALVES, L.R., AUGUSTOWSKI, M. & ANDRIOLO, A. 2015. Occurrence, distribution and behaviour of Bryde's whales (Cetacea: Mysticeti) off south-east Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 1–12.
- GROCH, K.R., PALAZZO JR., J.T., FLORES, P.A.C., ADLER, F.R. & FABIAN, M.E. 2005. Recent rapid increases in the Brazilian right whale population. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 4(1): 41-47.
- GURJÃO, L.M., FURTADO-NETO, M.A.A., SANTOS, R.A. & CASCON, P. 2003. Notes on diet of sperm whales (Cetacea: Physeteroidea) stranded in Ceará State, Northeastern Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, 36: 67-75.
- HAMMOND, P.S., BEARZI, G., BJØRGE, A., FORNEY, K.A., KARKZMARSKI, L., KASUYA, T., PERRIN, W.F., SCOTT, M.D., WANG, J.Y., WELLS, R.S. & WILSON, B. 2012. *Stenella attenuate*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2012**: e T2079A17821189.en. Acesso em: 20 set. 2017.
- HEIDE-JØRGENSEN, M.P., BLOCH, D., STEFANSSON, E., MIKKELSEN, B., OFSTAD, L.H. & DIETZ, R. 2002. Diving behaviour of long-finned pilot whales *Globicephala melas* around the Faroe Islands. **Wildlife Biology**, 8: 307-311.
- HORWOOD, J.W. 1990. Biology and Exploitation of the Minke Whale. Boca Raton: **CRC**, 238pp.
- IUCN. 2018. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2018.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso: 29 ago. 2018.
- JAQUET, N., DAWSON, S. & DOUGLAS, L. 2001. Vocal behavior of male sperm whales: why do they click? **Journal of the Acoustical Society of America**, 109: 2254-2259.
- JEFFERSON. T.A. & SCHIRO A.J. 1997. Distribution of cetaceans in the offshore Gulf of Mexico. **Mammal Review**, 27: 27–50.
- JEFFERSON, T.A., WEBBER, M.A. & PITMAN, R.L. 2015. **Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification**. 2 ed. Amsterdam: Academic Press.
- KASUYA, T. 1975. Occurrence of *Globicephala melena* in the Western North Pacific. **The Science Whales Research Institute**, nº 27, 95-110.

- KATONA, S.K. & WHITEHEAD, H. 1981. Identifying humpback whales using their natural marks. **Polar Record**, 20: 439-444.
- KUCZAJ II, S.A. & YEATER, D.B. 2007. Observations of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) off the coast of Utila, Honduras. **Journal of the Marine Biological Association of the U.K.**, 87(01), 141-148.
- LEDUC, R.G., DIZON, A.E., GOTO, M., PASTENE, L.A., KATO, H., NISHIWAKI, S., LEDUC, C.A. & BROWNELL JR., R.L. 2007. Patterns of genetic variation in Southern Hemisphere blue whales and the use of assignment test to detect mixing on the feeding grounds. **Journal of Cetacean Research and Management**, 9: 73-80.
- LEDUC, R.G., ARCHER, F.I., LANG, A.R., MARTIEN, K.K., HANCOCK-HANSER, B., TORRES-FLOREZ, J.P., HUCKE-GAETE, R., ROSENBAUM, H.C., VAN WAEREBEEK, K., BROWNELL JR., R.L. & TAYLOR, B.L. 2017 Genetic variation in blue whales in the eastern Pacific: implication for taxonomy and use of common wintering grounds. **Molecular Ecology**, 26:740-751.
- LODI, L. 1994. Ocorrências de baleias-jubarte, *Megaptera novaeangliae*, no Arquipélago de Fernando de Noronha, incluindo um resumo de registros de capturas no Nordeste do Brasil. **Biotemas**, 7(1 e 2): 116-123.
- LODI, L. & HETZEL, B. 1998. *Orcinus orca* (Cetacea; Delphinidae) em águas costeiras do Estado do Rio de Janeiro. **Bioikos**, 12: 46-54.
- LODI, L. & HETZEL, B. 1999. Rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, feeding behaviours in Ilha Grande Bay, Brazil. **Biociências**, 7: 29-42.
- LODI, L., SICILIANO, S. & BELLINI, C. 1996. Ocorrência e conservação da baleia-franca-do-sul, *Eubalaena australis*, no litoral do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 39(17): 307-328.
- LODI, L., OLIVEIRA, R., FIGUEIREDO, L., & SIMÃO, S. 2012. Movements of the rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*) in Rio de Janeiro State, south-eastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 5.
- LODI, L. & BOROBIA, M. 2013. **Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação**. Rio de Janeiro: Technical Books.
- LODI, L., TARDIN, R.H., HETZEL, B., MACIEL, I.S., FIGUEIREDO, L.D. & SIMÃO, S.M. 2015. Bryde's whale (*Ceratirodontomystax*: Balaenopteridae)

- occurrence and movements in coastal areas of southeastern Brazil. **Zoologia**, 32: 171–175.
- LUCENA, A. 2006. Estrutura populacional da *Balaenoptera bonaerensis* (Burmeister 1867) (Cetacea, Balaenopteridae) nas áreas de reprodução do Oceano Atlântico Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, 23(1): 176-185.
- MAGALHÃES, F.A., TOSI, C.H., GARRI, R.G., CHELLAPPA, S. & SILVA, F.L. 2008. Cetacean diversity on the Parnaíba Delta, Maranhão state, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 68(3): 545-551.
- MAHAFFY, S.D., BAIRD, R.W., MCSWEENEY, D.J., WEBSTER, D.L., & SCHORR, G.S. 2015. High site fidelity, strong associations, and long-term bonds: Short-finned pilot whales off the island of Hawaii. **Marine Mammal Science**, 31(4): 1427-1451.
- MANGOTT, A.H., BIRTLES, R.A. & MARSH, H. 2011. Attraction of dwarf minke whales *Balaenoptera acutorostrata* to vessels and swimmers in the Great Barrier Reef World Heritage Area – the management challenges of an inquisitive whale. **Journal of Ecotourism**, 10(1): 64-76.
- MARTIEN, K.K, HANCOCK-HANSER, B.B., BAIRD, R.W., KISKA, J.J, ASCHETTINO, J.M., OREMUS, M. AND HILL, M.C. 2017. Unexpected patterns of global population structure in melon-headed whales *Peponocephala electra*. **Marine Ecology Progress Series**, 577: 205-220.
- MARTINS, C.C.A., MORETE, M.E., ENGEL, M.H., FREITAS, A., SECCHI, E.R. & KINAS, P.G. 2001. Aspects of habitat use patterns of humpback whales in the Abrolhos bank, Brazil, breeding ground. **Memoirs of the Queensland Museum**, 47: 563-570.
- MEIRELLES A.N.O., MONTEIRO-NETO C., MARTINS A.M.A., COSTA A.F., Barros H.M.D.R. & Alves M.D.O. 2009. Cetacean strandings on the coast of Ceará, northeastern Brazil (1992-2005). **Journal Marine Biological Association United Kingdom**. 89(5):1083-1090.
- MELCÓN, M.L., MAURICIO, F. & INIGUEZ, M.A. 2012. Echolocation behavior of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in the wild. **Journal of the Acoustical Society of America**, 131(6): 448-453.

- MORENO, I.B., DANILEWICZ, D., BORGES-MARTINS, M., OTT, P.H., CAON, G. & OLIVEIRA, L.R. 2003. Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei* Fraser 1956) in southern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 2(1): 39-46.
- MORENO, I.G., ZERBINI, A.N., DANILEWICZ, D., SANTOS, M.C.O., SIMÕES-LOPES, P.C., LAÍLSON-BRITO JR., J. & AZEVEDO, A. 2005. Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, 300: 229-240.
- MOURA, J.F., ACEVEDO-TREJOS, E., TAVARES, D.C., MEIRELLES, A.C.O., SILVA, C.P.N, OLIVEIRA, L.R. 2016. Stranding events of *Kogia* whales along the Brazilian Coast. **PLoS ONE**, 11(1): e0146108.
- OLIVEIRA, I.T.G., FRAGOSO, A.B., COSTA, S.A.G.L. & SILVA, F.J.L. 2015. Primeiro registro de *Balaenoptera musculus* para o Estado do Rio Grande do Norte – Brasil. Livro de resúmenes. **X Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos (SOLAMAC)**, Cartagena, Colômbia. Pp. 835-836.
- OLSEN, E., BUDGELL, W.P., HEAD, E., KLEIVANE, L., NØTTESTAD, L., PRIETO, R., SILVA, M.A., SKOV, H., VÍKINGSSON, G.A., WARING, G. & ØIEN, N. 2009. First Satellite-Tracked Long-Distance Movement of a Sei Whale (*Balaenoptera borealis*) in the North Atlantic. **Aquatic Mammals**, 35: 313-318.
- OLSON, P.A. 2009. Pilot Whales In: **Encyclopedia of Marine Mammals** (Ed. by Perrin W.F., Würsig B. & Thewissen, J.G.M), pp 847-852. San Diego: Academic Press.
- OTTENSMEYER, C. A. & H. WHITEHEAD. 2003. Behavioural evidence for social units in long-finned pilot whales. **Canadian Journal of Zoology**, 81:1327-1338.
- PAPASTAVROU, V., SMITH, S.C. & WHITEHEAD, H. 1989. Diving behaviour of the sperm whale, *Physeter macrocephalus*, off the Galapagos Islands. **Canadian Journal of Zoology**, 67:839–846.
- PARO, A. D., ROJAS, E. & WEDEKIN, L. L. 2014. Southernmost record of the Atlantic spotted dolphin, *Stenella frontalis* in the south-west Atlantic Ocean. **Marine Biodiversity Records**, 7: e78.

- PASTENE, L., ACEVEDO, J., SICILIANO, S., SHOLL, T.G.C., DE MOURA, J.F., OTT, P.H. & AGUAYO-LOBO, A. 2015. Population genetic structure of the South American Bryde's whale. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, 50: 453–464.
- PAVANATO, H.J., WEDEKIN, L.L. Guilherme-Silveira, F.R., Engel, M.H. & Kinas, P.G. 2017. Estimating humpback whale abundance using hierarchical distance sampling. **Ecological Modelling**, 358: 10-18.
- PAYNE, R.S. & MCVAY, S. 1971. Songs of humpback whales. **Science**, 173:585–597.
- PERRYMAN, W. 2002. **Encyclopedia of Marine Mammals**: Melon-headed whale – *Peponocephala electra*. San Diego, CA: Academic Press.
- PERRIN, W.F., MITCHELL, E.D., MEAD, J.G., CALDWELL, D.K., CALDWELL, M.C., VAN BREE, P.J.H. & DAWBIN, W.H. 1987. Revision of the spotted dolphins, *Stenella* spp. **Marine Mammal Science**, 3: 99-170.
- PERRIN, W.F. & MEAD, J.G. 1994. Clymene dolphin *Stenella clymene* (Gray, 1846). **Handbook of Marine Mammals**, Vol. 5: The First Book of Dolphins (eds S.H. Ridgway and R. Harrison) pp. 161-171. London: Academic Press, 416 pp.
- PERRIN W.F. 2002. *Stenella frontalis*. **Mammalian Species**, 702: 1-6.
- PERRIN W.F., WURSIG B. & THEWISSEN, J.G.M. 2009. **Encyclopedia of Marine Mammals**, 2 ed. San Diego: Academic Press.
- PINEDO, M.C., LAMMARDO, M. & BARRETO, A.S. 2001. Review of *Ziphius cavirostris*, *Mesoplodon grayi* and *Lagenodelphis hosei* (Cetacea: Ziphiidae and Delphinidae) in Brazilian waters, with new records from southern Brazil. **Atlântica**, 23: 67-76.
- Praderi, R., M. C. Pinedo & E. A. Crespo. 1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. p. 52–56. In: W.F. Perrin; R.L. Brownell, K.Y. Zhou & J.K. Liu [Eds.], **Biology and conservation of the river dolphins**. Occasional papers of the IUCN Species Survival Commission (SSC) 3.
- PRETTO, D.J., ANDRADE, M.C.M., OLIVEIRA, J.M., & OLIVEIRA, M.G.A. 2009. First record of a humpback whale, *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781),

- stranding in Pará State, Northern coast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 69(4): 1207-1208.
- RANKIN, S. & BARLOW, J. 2005. Source of the North Pacific “boing” sound attributed to minke whales. **The Journal of the Acoustical Society of America**, 118(5), 3346-3351.
- REEVES, R.R., STEWART, B.S., CLAPHAM, P.J. & POWELL, J.A. 2002. **Sea mammals of the world**. New York: Chanticleer Press.
- REILLY S.B., BANNISTER J.L., BEST P.B., BROWN M., BROWNELL R.L. JR., BUTTERWORTH D.S., CLAPHAM P.J., COOKE J., DONOVAN G.P., URBÁN J. & ZERBINI A.N. 2008. *Balaenoptera acutorostrata*. IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 31 jul. 2013.
- RENDELL, L. E., & WHITEHEAD, H. 2003. Vocal clans in sperm whales (*Physeter macrocephalus*). Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, **270(1512)**: 225-231.
- RICE, D. W. 1989. Sperm whale, *Physeter macrocephalus*, Linnaeus, 1758. In: **Handbook of Marine Mammals** (Ed. by Ridgway, S. H. & Harrison, R.), pp. 177-233. London: Academic Press.
- RICE, D.W. 1998. Marine mammals of the world: Systematics and distribution. **The Society for Marine Mammalogy**, Special Publication Number 4.
- RICE, D.W. 2002. Baleen. In: **Encyclopedia of Marine Mammals** (Ed. by PERRIN, W.F., WURSIG, B. & THEWISSON, J.G.M.). San Diego: Academic.
- ROSSI-SANTOS, M.R., WEDEKIN, L.L. & Sousa-Lima, R.S. 2006a. Distribution and habitat use of small cetaceans in the Abrolhos Bank, Eastern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, 5(1): 23-28.
- ROSSI-SANTOS, M.R., BARACHO, C., NETO, E.S. & MARCOVALDI, E. 2006b. First sighting of the pygmy killer whale, *Feresa attenuata*, for the Brazilian coast. **JMBA 2 – Biodiversity Records**.
- ROSSI-SANTOS, M.R. & FINCKL, C.W. (Eds.). 2018. Advances in marine vertebrate research in latin America. Coastal Research Library 22. **Springer International Publishing**, New York.

- SANTOS, M.C.O., & Silva, E. 2009. Records of a male killer whale (*Orcinus orca*) off southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 57: 65-68.
- SANTOS, M.C.O., SICILIANO, S., VICENTE, A.F.D.C., ALVARENGA, F.S., ZAMPIROLI, É., SOUZA, S.P.D. & MARANHO, A. 2010. Cetacean records along São Paulo State coast, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 2, p. 123- 142.
- SECCHI, E. R. & P. H. OTT. 2000. A profundidade como um fator determinante da distribuição de toninhas, *Pontoporia blainvillei*, conforme indicado pelos índices de CPUE. In: UNEP/CMS (ed.), **Report of the Third Workshop for Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Southwestern Atlantic**. UNEP/CMS, Bonn, Germany.
- SHIRIHAI, H. & JARRET, B. 2006. **Whales, dolphins and other marine mammals of the world. Princeton Field Guides**. Princeton and Oxford: Princeton University.
- SICILIANO, S., DI BENEDITTO, A. P. M. & Ramos, R. M. A. 2002. A Toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea. Pontoporiidae), nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia**. v. 476, pp. 1-15.
- SICILIANO, S., OLIVEIRA SANTOS, M.C., VICENTE, A.F., Alvarenga, F.S., Zampiroli, E., Brito, J.L. & Pizzorno, J.L.A. 2004. Strandings and feeding records of Bryde's whales (*Balaenoptera edeni*) in south-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, 84:857–859.
- SILVA, V.M.F. & BEST, R.C. 1996. *Sotalia fluviatilis*. **Mammalian Species**, v. 527, pp. 1-7.
- SILVA-JR. J.M. & SAZIMA, I. 2008. Whalesuckers on spinner dolphins: An underwater view. **Marine Biodiversity Records**, v. 1.
- SIMÕES-LOPES, P.C., PALAZZO, JR., J.T., BOTH, M.C. & ZIMENEZ, A. 1992. Identificação, movimentos e aspectos biológicos da baleia franca austral (*Eubalaena australis*) na costa sul do Brasil. **Anales del III Reunión de**

- Trabajo de Especialista en Mamíferos Acuáticos de América del Sul**, pp. 62-66.
- SIMÕES-LOPES, P.C., PRADERI, P. & PAULA, G.S. 1994. The clymene dolphin, *Stenella clymene* (Gray, 1846), in the southwestern South Atlantic Ocean. **Marine Mammal Science**, 10(2): 213-217.
- SIMÕES-LOPES, P.C., DAURA-JORGE, F.G., LODI, L., BEZAMAT, C., COSTA, A.P.B. & WEDEKIN, L.L. 2018. Bottlenose dolphin ecotypes in the western South Atlantic: exploring the puzzle of dorsal fin shapes, colors and habitats. In: **Abstract book of the 32nd Annual Conference of the European Cetacean Society**, La Spezia, Italy, p. 130-131.
- STEVICK, P.T., PACHECO DE GODOY, L., MCOSKER, M., ENGEL, M.H. & ALLEN, A. 2006. A note on the movement of a humpback whale from Abrolhos Bank, Brazil to South Georgia. **Journal of Cetacean Research Management**, 8: 297–300.
- TAVARES, M., MORENO, I.B., SICILIANO, S., RIDRÍGUEZ D., Santos, M.C.O., Laílson-Brito JR, J. & Fabián, M.E. 2010. Biogeography of common dolphins (genus *Delphinus*) in the Southwestern Atlantic Ocean. **Mammal Review**, v. 40, p. 40-64.
- TAYLOR, B.L., BAIRD, R., BARLOW, J., DAWSON, S.M., FORD, J., MEAD, J.G., NOTARBARTOLO DI SCIARA, G., WADE, P. & Pitman, R.L. 2008. *Peponocephala Electra*. IUCN 2017. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2017. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso: 29 set. 2018.
- TELLECHEA, J.S. & NORBIS, W. 2014. Sound characteristics of two neonatal franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*). **Marine Mammal Science**, 30(4): 1573 - 1580.
- THEWISSEN, M.G.J & WILLIAMS, E.M. 2002. The Early Radiations of Cetacea (Mammalia): Evolutionary Pattern and Developmental Correlations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33:73-90.
- TODD, V., TODD, I., GARDINER, J. & MORRIN, E. 2015. **Marine Mammal Observer and Passive Acoustic Monitoring Handbook**. [S.I.]: Pelagic Publishing. 395p.

- TOLEDO, G. & LANGGUTH, A. 2009. Data on biology and exploitation of West Atlantic sperm whales, *Physeter macrocephalus* (Cetacea: Physeteridae) off the coast of Paraíba, Brazil. **Zoologia**, 26(4): 663-673.
- TORRES-FLOREZ, J.P., HUCKE-GAETE, R., LEDUC, R., LANG, A., TAYLOR, B., PIMPER, L.E., BEDRINANA-ROMANO, L., ROSENBAUM, H.C. AND FIGUEROA, C.C. 2014. Blue whale population structure along the eastern South Pacific Ocean: evidence of more than one population. **Molecular Ecology**, 23: 5998-6010.
- TOSI, C.H., Magalhães, F.A. & Garri, R.G. 2009. Meat consumption of a Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) stranded alive on the northern Brazilian coast. **Marine Biodiversity Records**, 2: e4.
- WADA, S., OISHI, M. & YAMADA, T.K. 2003. A newly discovered species of living baleen whale. **Nature**, 426: 278-28.
- WADE, P.R. & GERRODETTE, T. 1993. Estimates of Cetacean Abundance and Distribution in the Eastern Tropical Pacific. **The Report of International Whale Commission**, 43.
- WARD, E., ZERBINI, A.N., KINAS, P.G., ENGEL, M.H. & ANDRIOLO, A. 2011. Estimates of population growth rates of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the wintering grounds off the coast of Brazil (Breeding Stock A). **Journal of Cetacean Research and Management**, 3: 145-149.
- WARING, G.T., JOSEPHSON, E., FAIRFIELD-WALSH, C.P. & MAZE-FOLEY, K. 2008. U.S. Atlantic and Gulf of Mexico Marine Mammal Stock Assessments. **NOAA Technical Memorandum**, NMFS NE 210; p. 440.
- WEDEKIN, L.L., FREITAS, A.C., ENGEL, M.H. & SAZIMA, I. 2004. Rough-toothed-dolphin (*Steno bredanensis*) catch diskfishes while interacting with humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Abrolhos Bank breeding ground, Southwest Atlantic. **Aquatic Mammals**, 30(2): 327-329.
- WEDEKIN, L.L., ROSSI-SANTOS, M.R., BARACHO, C., CYPRIANO-SOUZA, A.L. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2014. Cetacean records along a coastal-offshore gradient in the Vitória-Trindade Chain, western South Atlantic Ocean. **Brazilian Journal of Biology**, 74(1): 137-144.

- WEDEKIN, L.L., ENGEL, M.H., ANDRIOLO, A., PRADO, P.I., ZERBINI, A.N., MARCONDES, M.C.C., KINAS, P.G. & SIMÕES-LOPES, P.C. 2017. Running fast in the slow lane: rapid population growth of humpback whales after exploitation. **Marine Ecology Progress Series**, 575: 195-206.
- WELLS, R.S., BORDINO, P. & DOUGLAS, D.C. 2013. Patterns of social association in the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Marine Mammal Science**, 29(4): 20-28.
- WHITEHEAD, H. & WEILGART, L. 2000. The sperm whale: social females and roving males. In: **Cetacean Societies: field studies of dolphins and whales** (Ed. by MANN, J., CONNOR, R. C., TYACK & H. WHITEHEAD, P. L.), pp. 154-172. Chicago: University of Chicago Press.
- WHITEHEAD, H. 2002. **Sperm whales social evolution in the ocean**. Chicago: The University of Chicago, p. 431.
- WILLIAMSON, G.R. 1975. Minke whales off Brazil. **Scientific Reports Whales Research Institute**, 27: 37-59.
- ZERBINI, A.N., SECCHI, E.R., SICILIANO, S. & SIMÕES-LOPES, P.C. 1997. A review of the occurrence and distribution of whales of the Genus *Balaenoptera* along the Brazilian Coast. **Report of the International Whaling Commission**, 47: 407-417.
- ZERBINI, A.N., SECCHI, E.R., BASSOI, M., DALLA ROSA, L., HIGA, A., SOUSA, L., MORENO, I.B., MÖLLER, L. & CAON, G. 2004a. Distribuição e abundância relativa de cetáceos na Plataforma Continental Externa e Talude no Sul e Sudeste do Brasil: resultados do programa REVIZEE e perspectivas futuras. São Paulo: Instituto Oceanográfico da USP.
- ZERBINI, A.N., ANDRIOLO, A., DA ROCHA, J.M., SIMÕES-LOPES, P.C., SICILIANO, S., PIZZORNO, J.L., WAITE, J.M., DEMASTER, D.P. & VANBLARICON, G.R. 2004b. Winter distribution and abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Northeastern Brazil. **Journal of Cetacean Research and Management**, 6: 101-107.
- ZERBINI, A.N., ANDRIOLO, A., HEIDE-JORGENSEN, M.P., PIZZORNO, J.L., MAIA, Y.G., VANBLARICOM, G.R., DEMASTER, D.P., SIMÕES-LOPES, P.C., MOREIRA, S. & BETHLEM, C. 2006. Satellite-monitored movements of

humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, 313: 295–304.

ZIMMER, C. 1998. At the water's edge: macroevolution and the transformation of life. New York: Free Press.