



Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (FASE I) DOS  
SEDIMENTOS DO ESTUÁRIO DO RIO CAPIBARIBE UTILIZANDO  
EMBRIÕES DE *Danio rerio***

SÂMARA DA SILVA GOMES

Recife  
2018

SÂMARA DA SILVA GOMES

**Avaliação e Identificação da Toxicidade (Fase I) dos sedimentos do estuário do Rio  
Capibaribe utilizando embriões de *Danio rerio***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso  
de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical  
- PGCAT, como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal Tropical.

Orientador:

**Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena**

Coorientadora:

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro**

Recife

2018

SÂMARA DA SILVA GOMES

**Avaliação e Identificação da Toxicidade (Fase I) dos sedimentos do estuário do Rio Capibaribe utilizando embriões de *Danio rerio***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade.

**Data de defesa: 27/02/2018.**

---

Sâmara da Silva Gomes

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Orientador)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro (Coorientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Adelia Borstelmann de Oliveira (1<sup>o</sup> Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante (2<sup>o</sup> Titular)

Universidade do Porto

*Dedico aos meus pais, por todo amor,  
dedicação, incentivo, suporte e por  
estarem ao meu lado em todos os  
momentos. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que em todos os momentos não me desamparou e que vem mostrando, mesmo que às vezes eu não compreenda, que seus planos são perfeitos e agradáveis para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, por toda oportunidade, confiança e atenção necessária para execução deste trabalho.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro, por toda ciência e suporte nessa jornada acadêmica.

Aos meus pais, por todo zelo, amor, educação e por todo incentivo e participação, desde cartazes de feira de ciências a inscrições de doutorado. Por todo apoio, mais também toda cobrança, pois sempre acreditaram que eu podia ser e fazer melhor.

Ao marido e companheiro Augusto, por estar ao meu lado em todos os momentos, por sonhar comigo e por me fazer almejar um futuro melhor, obrigado toda sua dedicação e amor.

Aos meus familiares que mesmo distantes sempre me apoiam e oram por mim, me incentivando a voar mais cada vez mais alto.

Aos amigos que a vida me presenteou durante esta etapa, aos meus amigos de laboratório Erickson, Ana Carla, Gabriel, Luís, Jadson, Thiago, Thamires e Marília, por me acompanhar e colaborar com este processo e por tornarem meu trabalho e meus dias no laboratório mais suaves e agradáveis.

À FACEPE pelo apoio financeiro com auxílio indispensável no desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço de coração a todos que, de alguma forma, me ajudaram e deram sua contribuição para eu chegar até aqui. É um capítulo que se conclui, para outro começar.

Muito obrigado!

*“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)*

## RESUMO

O complexo estuarino do Rio Capibaribe é um dos sistemas hídricos mais importantes do estado de Pernambuco, infelizmente, a ação das atividades humanas em seu entorno associadas às elevadas cargas de contaminantes provenientes principalmente do lançamento de efluentes domésticos e industriais, têm resultado em um elevado nível de poluição ambiental. Estudos anteriores apontaram diversos grupos de substâncias responsáveis pela sua contaminação, desta forma, no presente trabalho foi empregado o processo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) utilizando embriões de *Danio rerio* como organismo teste expostos aos elutriados dos sedimentos estuarinos, visando uma nova alternativa de avaliação da toxicidade, na utilização de um vertebrado marinho e de parâmetros subletais (frequência cardíaca e teratogenicidade). O princípio desse método baseia-se no fracionamento das amostras por meio de uma série de processos (filtração, aeração, adições de EDTA e Tiosulfato de sódio), objetivando tornar indisponíveis certos grupos de substâncias para verificação de seus efeitos. Mediante aos resultados obtidos os parâmetros subletais, demonstraram maior sensibilidade as amostras e confirmaram que são *endopoints* relevantes a serem incluídos em testes ecotoxicológicos. Antes da realização das manipulações do AIT, foi observado no Teste Base, que a toxicidade das amostras é influenciada pela pluviometria, demonstrando a importância da avaliação nos períodos secos e chuvosos em amostras ambientais. Após a confirmação da toxicidade dos três pontos de coleta pelo Teste Base e a aplicação das manipulações dos AIT, verificou-se a redução significativa da toxicidade dos elutriados principalmente os manipulados com a filtração e adição de EDTA. Estas manipulações do AIT apontaram respectivamente, compostos associados as partículas do sedimento e metais catiônicos como maiores responsáveis pela toxicidade dos sedimentos. Esta variedade de agentes tóxicos indicados pode ser atribuída a diversidade de atividades realizadas na área, as diferentes influências sofridas pelos pontos estudados e ao regime de chuvas, marés e correntes, indicando a necessidade de monitoramento constante da região.

Palavras chave: Ecotoxicologia, Paulistinha, Teratogenicidade, Frequência cardíaca, Recife/PE.

## **ABSTRACT**

The estuarine complex of the Capibaribe River is one of the most important water systems in the state of Pernambuco. Unfortunately, the activity of human activities in its surroundings associated to the high loads of contaminants originating mainly from the discharge of domestic and industrial effluents, have resulted in a high level of environmental pollution. Previous studies have pointed out several groups of substances responsible for their contamination. In this work, the Toxicity Assessment and Identification (AIT) process was employed using *Danio rerio* embryos as test organism exposed to the elutriates of the estuarine sediments, aiming at a new alternative toxicity, the use of a marine vertebrate and sublethal parameters (heart rate and teratogenicity). The principle of this method is based on the fractionation of the samples by means of a series of processes (filtration, aeration, additions of EDTA and Sodium thiosulphate), aiming to make certain groups of substances unavailable to verify their effects. By means of the results obtained the sublethal parameters, demonstrated greater sensitivity to the samples and confirmed that they are relevant endpoints to be included in ecotoxicological tests. Before carrying out the AIT manipulations, it was observed in the Base Test that the toxicity of the samples is influenced by rainfall, demonstrating the importance of the evaluation in the dry and rainy periods in environmental samples. After confirming the toxicity of the three collection points by the Base Test and the application of TIA manipulations, a significant reduction in the toxicity of elutriates was verified, especially those manipulated with EDTA filtration and addition. These manipulations of AIT indicated, respectively, compounds associated with sediment particles and cationic metals as being more responsible for sediment toxicity. This variety of toxic agents can be attributed to the diversity of activities carried out in the area, the different influences suffered by the points studied and the regime of rains, tides and currents, indicating the need for constant monitoring of the region.

Keywords: Ecotoxicology, Zebrafish, Teratogenicity, Heart rate, Recife / PE.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casal de zebrafish adultos.....	25
Figura 2 – Estágios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra em 24 horas pós fertilização (hpf), 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf.....	26
Figura 3 – Indústrias localizadas ao longo da área de estuário no estuário do Rio Capibaribe.....	33
Figura 4 – Bacia Hidrográfica do Rio Capibaribe.....	37
Figura 5 – Mapa dos pontos de coleta de sedimento do estuário do Rio Capibaribe nos períodos chuvoso e seco.....	38
Figura 6 – Ponto de Coleta próximo a Ponte da Caxangá.....	38
Figura 7 – Ponto de Coleta próximo a Parque Santana.....	39
Figura 8 – Ponto de Coleta próximo a Prefeitura do Recife.....	39
Figura 9 – Elutriato preparado das duas coletas.....	40
Figura 10 – Manipulações realizadas na Fase I do AIT do presente estudo.....	42
Figura 11 – Filtros de acetato e manipulação dos elutriatos.....	43
Figura 12 – Aeração das amostras de elutriato.....	44
Figura 13 – Desenvolvimento dos embriões após 96h expostos aos elutriatos dos períodos chuvoso e seco.....	50
Figura 14 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P1/chuvoso após 96h.....	54
Figura 15 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P1/seco após 96h.....	56
Figura 16 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P2/chuvoso após 96h.....	59
Figura 17 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P2/seco após 96h.....	62

Figura 18 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P3/chuvoso após 96h.....	64
Figura 19 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P3/seco após 96h.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos tipos de amostras e respectivos estudos de AIT.....	22
Tabela 2 – Categorias de agentes tóxicos caracterizados pelas diferentes manipulações da Fase I (Adaptado de CETESB, 2010) .....	23
Tabela 3 – Canais que aportam na bacia do Rio Capibaribe.....	32
Tabela 4 – Lista das indústrias localizadas ao longo da área estudada no presente trabalho no estuário Rio Capibaribe. (Adaptada de CPRH, 2011) .....	33
Tabela 5 – Coordenadas geográficas e características dos pontos de amostragem no estuário do Rio Capibaribe.....	40
Tabela 6 – Análises granulométricas dos sedimentos coletados nos pontos de amostragem do rio Capibaribe.....	46
Tabela 7 – Resultados do teste base ecotoxicológico realizado com os elutriatos dos dois períodos de coleta de sedimento do estuário do rio Capibaribe.....	46
Tabela 8 – Indicação de possíveis contaminantes mediante a eficiência significativa das manipulações realizadas nos elutriatos do rio Capibaribe nos períodos chuvoso e seco.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Coagulação média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* expostos por 72h aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante os períodos seco e chuvoso..... 47
- Gráfico 2 – Eclusão média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferenças significativas) ..... 48
- Gráfico 3 – Mortalidade total média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferenças significativas) ..... 49
- Gráfico 4 – Teratogenicidade média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferença significativa) ..... 49
- Gráfico 5 – Batimentos cardíacos médios ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* durante as 96h de exposição aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso. (\* = diferenças significativas) ..... 51
- Gráfico 6 – Batimentos cardíacos médios ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* durante as 96h de exposição aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período seco. (\* = diferenças significativas) ..... 52
- Gráfico 7 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas) ..... 53
- Gráfico 8 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas) ..... 55
- Gráfico 9 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas) ..... 56

Gráfico 10 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 1 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	57
Gráfico 11 – Média das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 2 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	59
Gráfico 12 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 2 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	60
Gráfico 13 – Média das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 2 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	61
Gráfico 14 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 2 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	63
Gráfico 15 – Média das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas no elutriato do Ponto 3 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	64
Gráfico 16 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 3 do período chuvoso comparados o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	65
Gráfico 17 – Média das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 3 do período seco comparadas com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	67
Gráfico 18 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$ desvio padrão) realizadas nos elutrios do Ponto 3 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (* = diferenças significativas) .....	68

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	A ECOTOXICOLOGIA E SEUS TESTES .....	19
2.1.1	Avaliação e Identificação de Toxicidade (AIT) .....	21
2.2	O USO DO <i>Danio rerio</i> E SEUS EMBRIÕES COMO ORGANISMOS TESTE.....	24
2.3	SEDIMENTO vs. CONTAMINAÇÃO .....	27
2.4	IMPORTÂNCIA E CONTAMINAÇÃO DOS ESTUÁRIOS .....	30
3	<b>OBJETIVO</b> .....	35
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	36
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	36
4.2	COLETA DO SEDIMENTO .....	37
4.3	PREPARO DO ELUTRIATO.....	40
4.4	OBTENÇÃO E CULTIVO DOS ORGANISMOS-TESTE.....	41
4.5	TESTES ECOTOXICOLÓGICOS .....	41
4.6	MANIPULAÇÕES DO AIT .....	42
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
5	<b>RESULTADOS</b> .....	46
5.1	CARACTERIZAÇÃO GRANULOMETRICA .....	46
5.2	TESTE BASE.....	46
5.3	AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT) .....	52

5.3.1	<b>Ponto 1</b> .....	52
5.3.2	<b>Ponto 2</b> .....	57
5.3.3	<b>Ponto 3</b> .....	63
6	DISCUSSÕES.....	70
6.1	TESTE BASE E ANÁLISE GRANULOMÉTRICA.....	70
6.2	AIT.....	72
6.2.1	<b>Ponto 1</b> .....	72
6.2.2	<b>Ponto 2</b> .....	73
6.2.3	<b>Ponto 3</b> .....	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## 1 INTRODUÇÃO

A Cidade do Recife tem seu processo de urbanização determinado pela presença dos rios, em particular o Capibaribe, com uma área estuarina de aproximadamente 15 km, totalmente inserido na área urbana. (OLIVEIRA *et al.*, 2014). As características físicas, químicas e hidrodinâmicas destas regiões favorecem condições ótimas para o habitat de grande parte dos recursos marinhos, o que as tornam de grande relevância biológica. (MARTINS *et al.*, 2007). Entretanto, atualmente a maioria dos estuários recebe uma grande quantidade de rejeitos produzidos nos centros urbanos e industriais sem tratamento adequado, o que vem modificando as condições ambientais destes locais, afetando diretamente os organismos que nele habitam, causando distúrbios fisiológicos e letais (BARROS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2016).

Os estuários são ecossistemas costeiros que funcionam como barreiras biogeoquímicas, retendo as partículas em suspensão e os poluentes adsorvidos à estas (SHUBEL; CARTER 1989; TOLOSA *et al.*, 2004). Os sedimentos podem atuar como vias de exposição a poluentes para os organismos (CHAPMAN, 1989; KIM *et al.*, 2011), pois concentram uma fração considerável dos contaminantes que chegam aos estuários, devido à grande afinidade química por carbono orgânico a maior parte dos contaminantes persistentes que chega nos ambientes aquáticos, proveniente de diversas fontes, acaba depositando-se nos sedimentos, fazendo com que os mesmos permaneçam associados a partículas de sedimento por longos períodos, mesmo após o término de eventos de lançamento no ambiente. Desta forma, tanto os organismos que utilizam o sedimento como habitat, estando em estreito contato com as partículas e com a água intersticial, como os que vivem ou se alimentam nas proximidades do sedimento podem ser adversamente afetados pela presença dos contaminantes (ABESSA *et al.*, 2006).

Devido à complexidade causada pelas interações das substâncias químicas no ambiente (ZAGATTO; BERTOLLETI, 2006; CARIELLO, 2012; SOUSA 2013) e a grande importância dos sedimentos como repositórios de contaminantes e por oferecer substrato para organismos, a resolução CONAMA N°454/2012 prevê:

“[...] A caracterização ecotoxicológica deve ser realizada em complementação à caracterização física e química, com a finalidade de avaliar os impactos potenciais à vida aquática, no local proposto para a disposição do material dragado. Os ensaios e os tipos de amostras (sedimentos totais, ou suas



frações - elutriato, água intersticial, interface água-sedimento) a serem analisadas serão determinados pelo órgão ambiental competente [...]” (CONAMA 454, 2012)

O AIT (Avaliação e Identificação da Toxicidade) ou TIE (Toxicity Identification Evaluation) é um dos mais importantes procedimentos usados para identificar a toxicidade em amostras ambientais. Foi desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA), inicialmente para avaliação de efluentes industriais, de forma que medidas mitigadoras pudessem ser implementadas e, posteriormente, avaliadas quanto à sua eficiência (ANKLEY; BURKHARD, 1989). Contudo, estudos demonstraram que também podem ser utilizadas com sucesso para identificação de compostos causadores de toxicidade em águas superficiais, solubilizados de resíduos perigosos, frações aquosas de sedimento e sedimento total (MATOS, 2011).

Este procedimento consiste em várias manipulações físicas e químicas das amostras, que viriam a alterar sua toxicidade decorrente da diminuição da concentração ou remoção do agente tóxico (BADARÓ-PEDROSO; RACHID, 2002). No estudo de AIT, o resultado ecotoxicológico das manipulações é comparado ao de uma amostra não manipulada que, integrado a análises químicas e outras técnicas, pode levar a identificação da substância causadora da toxicidade (LAVORANTE *et al.*, 2013).

Os peixes são excelentes ferramentas no acompanhamento da qualidade de ambientes aquáticos, servindo como importantes bioindicadores, pois respondem de várias maneiras à contaminação, como por exemplo, mudanças na taxa de crescimento, na maturação sexual, na estrutura populacional, danos em tecidos e/ou células, entre outros, podendo ajudar a prever alguns efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos naturais (WOOTON, 1990; MARTINEZ; SOUZA, 2002).

No Brasil, os testes ecotoxicológicos já vem há algum tempo utilizando os peixes como organismo teste, a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, padronizou duas espécies de peixes para realização de ensaios de toxicidade, o *Danio rerio* (Hamilton, 1822) e *Pimephales promelas*, para avaliar toxicidade aguda e crônica de curta duração, em exposições de 48 e 168 h, respectivamente (ABNT, 2004; 2007). Dentre as entidades de normatização a APHA (2005); ABNT NBR 15088:2011 (ABNT, 2011); OECD 236 (2013) e ABNT NBR 15499:2015 (ABNT, 2015) padronizaram a utilização o *D. rerio* em testes de toxicologia. Desde 2005, na Alemanha e em outros países europeus, uma modalidade do ensaio de toxicidade aguda com peixe, o teste com

embriões ou ovos recém-fecundados (FET TEST), vem substituindo o teste agudo com peixes adultos e tornou-se obrigatório para o monitoramento de efluentes (BRAUNBECK; LAMMER, 2006), pois considerar apenas os efeitos sobre a sobrevivência do *D. rerio* pode nem sempre ser suficiente para a caracterizar a toxicidade de amostras ambientais, por isso efeitos subletais podem ser um boa ferramenta de avaliação (ARENZON *et al.*, 2013).

Mesmo *Danio rerio* sendo uma espécie exótica no Brasil, estudos tem demonstrado que sua utilização é viável, podendo substituir as espécies nativas nos ensaios de toxicidade (BERTOLETTI, 2009). O *D. rerio*, conhecido por “zebrafish” ou paulistinha, dentre os outros peixes tem sido amplamente utilizado em estudos de ecotoxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008) por causa das diversas vantagens que a tornam uma espécie modelo seguro para ensaios ecotoxicológicos, por possuírem um ciclo de vida rápido, grande quantidade de embriões produzidos a cada ciclo de reprodução e seu tamanho pequeno, são bastante sensíveis a uma grande quantidade de substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004; TESOLIN *et al.*, 2014).

Portanto, a proposta desta pesquisa foi utilizar o *Danio rerio* como organismo teste na Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe, buscando respostas sobre os efeitos letais e subletais em decorrência dos possíveis contaminantes deste ambiente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A ECOTOXICOLOGIA E SEUS TESTES

O termo “ecotoxicologia” foi inicialmente utilizado por René Truhaut em 1969, que a caracterizou como o ramo da toxicologia que investiga os efeitos tóxicos de poluentes químicos nos ecossistemas, abrangendo desde sua entrada no ambiente até suas implicações nos organismos, populações e comunidades expostas (TRUHAUT, 1977).

A ecotoxicologia é a integração de duas linhas da biologia já consolidadas, a ecologia e a toxicologia clássica. Foi inicialmente impulsionada pelo rápido e contínuo desenvolvimento industrial, o qual acarretou no uso intensivo de produtos químicos, como compostos orgânicos, metais e pesticidas (CHAPMAN, 1995). Tem como objetivo compreender e prever efeitos biológicos de substâncias químicas e/ou exposição em condições reais nas comunidades naturais. Desta forma, conhecimentos teóricos e métodos oriundos da ecologia são necessários para alcançar este objetivo (CHAPMAN, 2002).

Os primeiros relatos de utilização de ensaios de ecotoxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, sendo os peixes os primeiros organismos a serem utilizados (ARAGÃO; ARAUJO, 2006). A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (RAND *et al.*, 1995). Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (ADAMS *et al.*, 2003; RONCO *et al.*, 2004).

A ecotoxicologia aquática envolve o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente. Os testes de toxicidade são bastante utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d’água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (KENDAALL *et al.*, 2001; GHERARDI-GOLDSREIN *et al.*, 1990).

A utilização de testes de toxicidade para avaliação dos efeitos potencialmente tóxicos de substâncias no ambiente marinho é importante para tomada de decisões, possibilitando a minimização e até mitigação de suas consequências no ambiente e para

o próprio homem. Estes efeitos podem ser letais a curto e/ou longo prazo, e/ou subletais, tais como mudança de comportamento, alterações do crescimento, da reprodução, da tomada de alimento e outros. Sendo assim, a avaliação ecotoxicológica dos efeitos de substâncias em organismos aquáticos é essencial para a manutenção da biodiversidade e da própria espécie humana (SOUZA, 2002).

Nesse sentido, estudos ecotoxicológicos podem avaliar efeitos tóxicos em diversos níveis de organização biológica, de indivíduos a ecossistemas (COSTA *et al.*, 2008). Sendo usados para a identificação de processos que indiquem a exposição ou efeitos de xenobióticos em vários níveis de organização (BARTELL, 2006). Desta forma, testes ecotoxicológicos fornecem informações fundamentais para a análise e gestão do risco ecológico, tornando-os amplamente úteis na formulação e instituição de políticas normativas e medidas administrativas que visem definir os limites toleráveis de emissão e concentração de substâncias químicas no ambiente (CHAPMAN, 2002). Esta ciência tornou-se uma importante ferramenta na avaliação de como substâncias químicas afetam diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar e proteger adequadamente a qualidade ambiental (CHAPMAN, 2002; CALOW, 1996).

Os testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos), consistindo na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo. Os efeitos tóxicos produzidos sobre os organismos são então observados e quantificados (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; COSTA *et al.*, 2008).

O uso dos testes ecotoxicológicos integra os conceitos da ecologia, em relação à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre comunidades biológicas (PLAA, 1982).

Para Abessa (2002) a utilização dos ensaios ecotoxicológicos apresenta diversas finalidades como:

- O conhecimento da qualidade das águas, solo e ar;
- A estimativa dos efeitos das descargas de contaminantes sobre as populações naturais;
- A definição de áreas críticas;

- Análise de risco ecológico;
- Integrar programas de monitoramento ambiental;
- Detecção dos primeiros sinais de impacto dos compostos químicos;
- Fornecimento do significado biológico para dados da contaminação.

Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com a duração e o sistema de exposição. Os testes de toxicidade aguda são empregados para avaliar os efeitos, que normalmente apresentam-se de forma severa e rápida, sofridos pelos organismos-teste quando expostos às substâncias selecionadas (AZEVEDO; CHASIN, 2003; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). O efeito avaliado nos testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos é a letalidade ( $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ ) ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade observado em invertebrados (CENO e CEO) (COSTA *et al.*, 2008).

Os testes de toxicidade crônica permitem avaliar os efeitos adversos sofridos pelos organismos-teste quando expostos a concentrações subletais de uma determinada amostra por pelo menos um terço do seu ciclo de vida, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos mesmos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (COSTA *et al.*, 2008).

### **2.1.1 Avaliação e Identificação de Toxicidade (AIT)**

Apesar dos testes de toxicidade serem ferramentas importantes para identificar os impactos de substâncias tóxicas no ambiente, eles não fornecem indicações diretas da causa ou origem específica da toxicidade (MELO *et al.*, 2013; HONGXIA *et al.*, 2004; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Conhecer a causa da toxicidade é fundamental para o seu eficiente controle, por isso a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*U.S.EPA: United States Environmental Protection Agency*) em 1991 desenvolveu um método para auxiliar na identificação de substâncias tóxicas em efluentes, denominada Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT), tendo como objetivo a redução e/ou a manutenção da toxicidade de efluentes a níveis aceitáveis (USEPA, 1991b).

Devido a necessidade de diversas metodologias de análise para identificar o composto tóxico presente em uma amostra, o estudo de AIT é baseado na utilização conjunta de manipulações físicas e químicas das amostras seguidas de ensaios ecotoxicológicos e no emprego de técnicas analíticas. As manipulações realizadas podem alterar a toxicidade e, desta forma, são realizadas comparações entre a amostra não manipulada e as frações da amostra submetida às várias manipulações. Com isto, é possível indicar características da (s) substância (s) causadora (s) da toxicidade, pois as alterações observadas podem ser decorrentes da diminuição da concentração do agente tóxico, da remoção ou alteração tornando-o biologicamente não disponível (BADARÓ-PEDROSO; RACHID, 2002; USEPA, 1991, 1992b; MELO *et al.*, 2013).

A U.S.EPA, inicialmente desenvolveu protocolos de AIT para amostras de efluentes industriais (USEPA, 1991). Melo (2012) observou que os EUA é o país que apresenta maior volume de trabalhos científicos empregando o protocolo de AIT, seguido pela Inglaterra e Canadá, no Brasil o protocolo de AIT ainda é pouco estudado, porém vem sendo utilizado em estudos ecotoxicológicos realizados em universidades e centros de pesquisas, em sua grande maioria, da região Sudeste.

Estudos de AIT realizados demonstraram que esta técnica pode ser empregada de forma eficiente em diferentes amostras, por exemplo mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Resumo dos tipos de amostras e respectivos estudos de AIT.

<b>Efluentes industriais ou domésticos</b>	FURLEY, 2009; YI <i>et al.</i> , 2011; KANG <i>et al.</i> , 2011; FANG <i>et al.</i> , 2012; MELO <i>et al.</i> , 2013; DAFLON, 2015
<b>Sedimento ou suas frações</b>	ANDERSON <i>et al.</i> , 2010; PERRON <i>et al.</i> , 2010; MEHLER <i>et al.</i> , 2010; MONTERO <i>et al.</i> , 2013 POLEZA, 2010; FERRAZ <i>et al.</i> , 2013
<b>Água</b>	MUÑOZ, <i>et al.</i> , 1994; REVELEZ; GESBERG, 1999; THOMAS <i>et al.</i> , 2001; ANDERSON <i>et al.</i> , 2006; BARBOSA, 2010; LAVORANTE, 2014.

O método de AIT compreende 3 fases distintas, Fase I: caracterização (USEPA; 1991, 1992b), Fase II: identificação (USEPA, 1993a) e Fase III: confirmação da toxicidade (USEPA, 1993b).

A Fase I visa caracterizar as propriedades físico-químicas dos compostos que causam a toxicidade através das manipulações da amostra que alteram ou eliminam a biodisponibilidade de substâncias com características similares. Nessa fase, os testes ecotoxicológicos em conjunto com as manipulações físicas e químicas da amostra, fornecem informações sobre a classe química dos compostos tóxicos.

A filtração fornece informações sobre substâncias tóxicas associadas a materiais filtráveis presentes na amostra. Os testes com aeração destinam-se a detectar se a causa da toxicidade é atribuída a compostos voláteis ou oxidáveis. A adição do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) pode identificar a toxicidade relacionada a metais catiônicos e a adição de tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) tem por finalidade detectar a toxicidade de substâncias oxidantes (USEPA, 1991b).

Tabela 2 – Categorias de agentes tóxicos caracterizados pelas diferentes manipulações da Fase I (Adaptado de CETESB, 2010)

<b>Manipulações</b>	<b>Agente alvo</b>
Filtração	Sólidos filtráveis ou compostos cuja solubilidade é influenciada por condições ácidas e básicas
Aeração	Sólidos voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) ou flotáveis (surfactantes) ou composto com volatilidade dependente do pH
Adição de EDTA	Metais catiônicos (Cr, Al, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Zn)
Adição de Tiosulfato de Sódio	Oxidantes (cloro, peróxidos) e metais catiônicos (Cu, Cd e Hg)

Em continuidade ao processo de AIT, a identificação (fase II) de uma ou mais substâncias específicas responsáveis pela toxicidade da amostra pode ser realizada através da aplicação de métodos analíticos, dependendo da classe do agente tóxico suspeito na primeira etapa. Na fase III, métodos alternativos podem ser designados para confirmar a identificação química, como por exemplo, estudos de correlação da toxicidade com o poluente em questão (concentração x toxicidade), avaliação dos sintomas, sensibilidade relativa, adição do agente tóxico à água controle ou à própria amostra para observar uma

proporcionalidade do efeito, testes de recuperação do agente tóxico seguidos de nova exposição para avaliação dos efeitos aos organismos testes, etc. (U.S.EPA, 1993b).

A Fase III é uma etapa que confirma o (s) composto (s) responsável (eis) pela toxicidade e é considerada uma etapa crítica, uma vez as manipulações químicas da Fase I podem introduzir artefatos que levem a conclusões errôneas sobre os quais são os compostos responsáveis pela toxicidade. Nesta etapa, deve-se, portanto, realizar testes para confirmar os verdadeiros compostos ou classe de compostos suspeitos, que incluem a avaliação da sensibilidade das substâncias suspeitas para os organismos teste, estudo de correlação (substância suspeita e amostra), observação das respostas dos organismos, realização de testes com contaminação do sedimento dentre outros procedimentos.

## 2.2 O USO DO *DANIO RERIO* E SEUS EMBRIÕES COMO ORGANISMOS TESTE

O peixe *Danio rerio* é uma espécie ovípara, teleósteo da família Cyprinidae, conhecido por “zebrafish” ou paulistinha no Brasil, originário da Índia e vem sendo utilizado mundialmente em estudos de ecotoxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Segundo Akande *et al.* (2010), sua utilização em pesquisas teve início de 1930, os motivos são bastante evidentes hoje em dia: é um vertebrado diplóide com um bom equilíbrio entre a complexidade e a simplicidade (STREISINGER *et al.* 1981). Suas características tornam este peixe um modelo seguro na pesquisa em nossos tempos (SPIRITA; AHILA, 2015), pois fornecem o maior número de informações a nível de desenvolvimento, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (KALUEFF *et al.*, 2013).

Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (BARBAZUK *et al.*, 2000; LIESCHKE; CURRIE, 2000), onde segundo Howe, *et al.*, 2013, quando comparados a humanos o peixe-zebra possui 70 % de similaridade genética. Este teleósteo possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central, como demonstrado em estudos com o cobre (GROSSEL; WOOD, 2002).



Outas vantagens que tornam essa espécie um modelo seguro em ensaios ecotoxicológicos são por possuírem um ciclo de vida rápido e em pouquíssimo tempo vários órgãos já estão formados (em média quatro dias), alta taxa de fecundidade, com um casal podendo colocar 200-300 ovos em uma manhã, seu tamanho pequeno, com poucos milímetros de comprimento, facilitando a acomodação em recipientes-teste, sua sensibilidade pode ser testada mesmo em baixíssimas concentrações de compostos químicos (TESOLIN *et al.*, 2014), encontra-se disponível comercialmente em diversos países, bastante popular entre os aquarífilos, podem suportar grandes variações de temperatura, pH e dureza da água, são bastante sensíveis a uma grande quantidade de substâncias químicas e atualmente, o *D. rerio* é reconhecido internacionalmente por diversas normas para ensaios ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004).

Em geral, os adultos atingem comprimento médio de 4,5 cm e a primeira desova ocorre quando as fêmeas atingem comprimento de aproximadamente de 25 mm e os machos, 23 mm e em média 75 dias de idade (Figura 1), quando expostos a temperatura de 25-26°C (LAALE, 1977). Segundo Johnson (1932), uma fêmea nunca expulsa ovos durante o cortejo até que o órgão genital entre em contato com o do macho, após isso uma pequena corrente de ovos é ejetada. Violentos ataques e perseguições caracterizam o cortejo, finalmente culminando em ovos sendo derramados um pouco a cada vez.

Figura 1 - Casal de zebrafish adultos



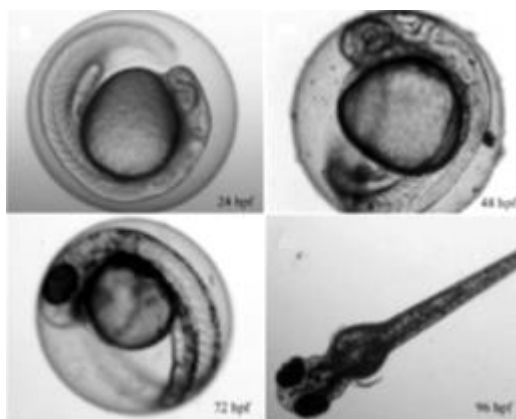
Fonte: Abyssos.gr, 2018.

Apesar do *D. rerio* ser uma espécie exótica no Brasil, estudos tem demonstrado que sua utilização é viável. Bertolleti (2009) realizou levantamento sobre sensibilidade de algumas espécies de peixes para realização de ensaios toxicológicos, foram utilizados *Danio rerio* (paulistinha), *Poecilia reticulata* (guarú), *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha) e *Serrapinnus notomelas* (piabinha) e o autor concluiu que as espécies

introduzidas *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*, poderiam substituir as espécies nativas nos ensaios de toxicidade.

Na Europa e muitos outros lugares, o uso de embriões de peixe não é regulado por legislações sobre bem-estar animal, portanto, são considerados como substituição de experimentos tradicionais com peixes (SCHOLZ *et al.*, 2008). Embriões de peixe (Figura 2) representam um modelo atraente para avaliação de risco ambiental de produtos químicos, já que possibilitam um superior enforme em pequena escala, além de apresentar uma excelente correlação entre o teste convencional *in vivo* com peixe adulto (LAMMER *et al.*, 2009b). Além de sua aplicação para determinar a toxicidade aguda, embriões de peixe também são excelentes modelos para estudos destinados à condição de tóxicos específicos, mecanismos e indicação de possíveis distúrbios adversos e efeitos a longo prazo (SCHOLZ *et al.*, 2008).

Figura 2 – Estágios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra em 24 horas pós fertilização (hpf), 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf.



Fonte: Autor, 2017.

As outras vantagens do uso de embriões de peixe-zebra são de serem ópticamente transparentes, permitindo a observação contínua de seus órgãos em desenvolvimento. O desenvolvimento do peixe-zebra é rápido, os principais sistemas de órgãos são evidentes dentro de 24 hpf, e todo o processo de desenvolvimento é completado por aproximadamente 5 dias após a fertilização. Além disso, a embriogênese ocorre fora da mãe, permitindo que a biologia do desenvolvimento seja estudada sem o sacrifício dos pais. Importante também é que todo o genoma do peixe zebra foi sequenciado. Os órgãos do peixe-zebra, incluindo os sistemas cardíaco, imune e nervoso, também compartilham características fenotípicas com os humanos. Os embriões de peixe-zebra vêm sendo,

portanto, amplamente utilizados para estudar os mecanismos moleculares associados aos efeitos tóxicos, induzidos por estresses externos tais como produtos químicos, temperatura e radiação (JING SI, 2017).

Observou-se que os estádios iniciais da vida dos peixes são geralmente mais sensíveis a compostos tóxicos em comparação com adultos e juvenis, então os embriões de peixe-zebra oferecem um bom modelo para investigar as avaliações de risco ecológico e ajudar determinar os processos críticos de desenvolvimento neurológico. Atualmente, a abordagem alternativa mais promissora para a toxicidade aguda dos peixes com peixes vivos é o teste com embriões o Fish Embryo Test (FET) (COOK *et al.*, 2005). O FET é um componente obrigatório na rotina de efluentes na Alemanha desde 2005 (DIN, 2001). O teste de efluentes com embriões de peixe-zebra tem sido padronizado a um Nível ISO (2007), e uma versão modificada foi feita pela Agência Federal Alemã para o Meio Ambiente (UBA) como um projeto de alternativa ao teste químico com peixes adultos (BRAUNBECK *et al.*, 2005).

Ambos os embriões (ovos) e eleuteroembriões (o intervalo de vida entre a eclosão e o início da alimentação exógena) são considerados alternativas no contexto da legislação europeia (EFSA, 2005). Além de parâmetros como adequação, confiabilidade e reprodutibilidade, tanto do ponto de vista científico como do ponto de vista regulamentar, características importantes para que o teste seja aceito como alternativa de um teste convencional é a correlação entre os resultados obtidos no teste alternativo e o teste a ser substituído. O FET mostrou sensibilidade, reprodutibilidade e adaptabilidade, encontrando caminho para os laboratórios, não só para produtos químicos fortes, mas também para investigações em amostras ambientais, (ex.: sedimentos ou partículas suspensas) (HALLARE *et al.*, 2005a; HOLLERT *et al.*, 2003).

### 2.3 SEDIMENTO VS. CONTAMINAÇÃO

Os sedimentos são ecologicamente, socialmente e economicamente importantes. Visto que é compartimento um dos principais componentes do ecossistema aquático, serve de substrato para que uma variedade de organismos que vivem no seu interior ou na interface (sedimento-água), formando uma variedade de habitats e ambientes. Além disso, são uma importante fonte de nutrientes para esses organismos, e indiretamente para

organismos de níveis tróficos mais elevados na cadeia alimentar. Há séculos o homem tem se beneficiado, na agricultura, com o enriquecimento dos solos com a deposição de sedimentos enriquecidos com nutrientes em áreas alagáveis marginais a rios e como fonte de minerais e outros materiais (SEDNET, 2003).

A avaliação da qualidade dos sedimentos constitui uma estratégia confiável na verificação da qualidade ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2013). Por sua capacidade de acumular contaminantes ao longo do tempo, tornando-se um depósito de contaminantes que entram nos estuários e sistemas costeiros (RODRÍGUEZ-OBESO *et al.*, 2007; HO; BURGESS, 2009), acumulando estes compostos em níveis muito mais elevados que aqueles observados na coluna de água adjacente (NIPPER *et al.*, 1989) e pela sua importância ecológica, os sedimentos têm sido utilizados como importantes indicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos, sendo considerados tão importantes quanto à coluna d'água em avaliações ambientais ou bioacumulação dos compostos nos organismos (CHAPMAN; MANN, 1999; LINKOV, 2001; ABESSA, 2002).

Além disso, inúmeros processos químicos, físicos e biológicos podem ocasionar a liberação dos contaminantes inorgânicos e orgânicos persistentes presentes nos sedimentos para a coluna d'água, trazendo riscos à biota que nela vive, sendo que esses processos ocorrem por ação da natureza e/ou por ação do homem (DELVALLS *et al.*, 2004; MONTERO *et al.*, 2013).

Historicamente a principal forma de avaliar a contaminação do sedimento era através de análises químicas, entretanto, somente esses resultados não são suficientes para determinar a qualidade do sedimento, pois muitos fatores podem afetar a biodisponibilidade dos contaminantes ali presentes (USEPA, 1999; PASCHOAL, 2002), o que não permite, o levantamento da verdadeira qualidade do sedimento.

Com isso, avaliações de sedimentos através de ensaios ecotoxicológicos têm sido extensivamente utilizados, tendo como vantagem principal diagnosticar qual o potencial tóxico de uma amostra sob condições controladas em laboratório. Segundo Costa *et al.* (2008) os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas utilizadas na avaliação de amostras ambientais, complementando as análises químicas e físico-químicas, que são comparadas com os limites estabelecidos nas legislações ambientais, mas que não são capazes de demonstrar os efeitos que estes causam na biota aquática. Assim, enquanto as análises

químicas identificam e quantificam os contaminantes presentes nas amostras, os ensaios de toxicidade avaliam os efeitos destes sobre a biota aquática.

Nos estudos com sedimento, as rotas de exposição podem ser quatro: sedimento total ou integral, água intersticial, elutriato e interface sedimento/água:

- Sedimento total ou integral: consiste na exposição de organismos bentônicos ao sedimento sem alteração, mantendo suas características físicas originais, não submetidas a tratamento prévio;
- Água intersticial: consiste na água que ocupa os espaços entre as partículas sólidas do sedimento. O ensaio consiste na exposição de organismos de coluna de água à fração de contaminantes nela contidos. A água intersticial é considerada como a rota dominante de exposição para muitos organismos;
- Elutriato: é a solução aquosa obtida após lavagem de uma amostra de sedimento. O ensaio ecotoxicológico é o mesmo utilizado para água intersticial;
- Interface sedimento/água: exposição de organismos a água sobrejacente em recipientes contendo sedimentos. É utilizado para avaliar os efeitos de contaminantes na interface do sedimento com a água (NIPPER, 1997).

A matéria orgânica tem grande afinidade com cátions de metais pesados, formando complexos, o que tem sido confirmado pelos estudos que revelam grande correspondência entre a quantidade de matéria orgânica presente no sedimento e os níveis de metais (MOALLA *et al.*, 1998). Segundo Salomons *et al.* (1987), na coluna d'água os metais encontram-se complexados com a matéria orgânica, mas na água intersticial o sulfeto compete com a matéria orgânica para estabelecer essa complexação.

O monitoramento dos sedimentos em sistemas aquáticos era realizado principalmente no sentido de controlar a quantidade dos sedimentos dragados. Pois, desde o início da revolução industrial, as emissões antropogênicas de poluentes na água têm causado uma rápida deterioração da qualidade dos sedimentos. Isto introduziu a necessidade de um novo tipo de monitoramento e gerenciamento da qualidade dos sedimentos (SEDNET, 2003).

## 2.4 IMPORTÂNCIA E CONTAMINAÇÃO DOS ESTUÁRIOS

Estuários são encontrados ao longo das costas ao redor do mundo independente da formação geológica, regime energético hidrodinâmico ou de ambiente deposicional. Constituem um importante elo na ecologia global, uma vez que é através destes ambientes que passa a maior parte da matéria originada da decomposição intempérica dos continentes em direção aos oceanos (SCHETTINI, 2002). Estes ambientes representam um dos sítios de sedimentação mais dinâmicos da Terra por representarem a transição os ambientes terrestres e marinhos, e evoluírem em respostas a interações de processos fluviais, costeiros e marinhos (PERILLO, 1995; ELLIOT; MACLUSCKY, 2002; FITZGERALD; KNIGHT, 2005).

Estes corpos d'água, por formarem áreas protegidas ao longo da costa, são propícios ao assentamento humano bem como o estabelecimento de portos comerciais. Os estuários geralmente são áreas mais produtivas quando comparadas com os rios e oceano adjacentes devido às características hidrodinâmicas da circulação que aprisionam nutrientes, algas e plantas (MIRANDA *et al.*, 2002).

Atuam como áreas de criação, refúgio temporário ou permanente de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos, que são recursos básicos para a pesca artesanal e industrial. Desta forma, estas regiões constituem-se um importante meio de vida para as populações ribeirinhas que retiram do estuário o seu sustento (BARROS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

Mediante a isto, este ecossistema atualmente recebe um grande aporte de contaminantes, que se dão através do lançamento de efluentes industriais e domésticos; da lixiviação do solo na área da bacia de drenagem; de fontes pontuais localizadas no estuário (portos, marinas e estaleiros) e também através da deposição atmosférica de partículas (e.g., fuligem resultante da combustão de combustível fóssil), o que vem modificando as condições ambientais destes locais (MORAES *et al.*, 2001).

O material particulado em suspensão e o sedimento podem atuar como vias de exposição a poluentes para organismos filtradores e detritívoros, bem como fontes secundárias de liberação de contaminantes para a coluna d'água (CHAPMAN, 1989; KIM *et al.*, 2011). Estes poluentes podem ocasionar efeitos relevantes sobre a biota, tais como redução na fecundidade dos organismos e atrasos no desenvolvimento (CHAPMAN,

1990). Além disso, propriedades físico-químicas dos poluentes (ex. elevada capacidade de se particionar para matrizes orgânicas) e características ambientais (ex. anoxia na coluna d'água) podem favorecer a retenção destes poluentes no estuário, prolongando a toxicidade (MACIEL *et al.*, 2015).

Dentre os vários estuários que formam a costa pernambucana, destaca-se o estuário do rio Capibaribe, não só pela sua extensão, mas principalmente pela sua importância socioeconômica, presente desde o princípio da colonização da região metropolitana do Recife. Infelizmente, este estuário é mais um exemplo típico de região estuarina impactada pela ação das atividades desenvolvidas pelo homem, pois recebe a influência de diversos tipos de fontes de poluentes, de caráter orgânico ou inorgânico (NOBREGA, 2011). O rio Capibaribe é responsável pelo abastecimento de várias cidades de Pernambuco, porém, no baixo Capibaribe, a porção do rio que banha o município de Recife, foi classificado como de qualidade “muito poluída” e seu estuário apresentando “alta ação antrópica”, segundo a Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (CPRH, 2006).

A bacia do rio Capibaribe se estende pelo Agreste Pernambucano marcado pela semiaridez, atravessa a Zona da Mata onde se desenvolveram os engenhos de cana de açúcar e atinge a área estuarina, no centro do Recife, para onde convergem outros cursos d'água: Beberibe, Tejipió e Jordão, formando uma série de ilhas (CONTÉCNICA-PQA/PE, 1998). Os reservatórios da bacia do rio são: Jucazinho, Carpina, Tapacurá, Goitá, Poço Fundo, Eng. Gercino de Pontes, Várzea do Una, Oitis, Santa Luzia, Matriz da Luz, Machado, Lagoa do Porco, sendo o reservatório de Tapacurá o maior deles, que abastece a capital pernambucana.

Dentro da bacia hidrográfica do rio Capibaribe encontram-se também áreas de proteção ambiental, que segundo relatório de monitoramento da CPRH são: Mata de Dois Irmãos, Mata do Eng. Tapacurá, Mata Outeiro do Pedro, Mata de São João da Várzea, Mata de Quizanga, Mata do Toró, Mata Camucim e a Reserva de Preservação Permanente Natural da Fazenda Bituri (CPRH, 2000).

Do ponto de vista das ocupações urbanas e industriais, a bacia do rio Capibaribe é um ambiente muito explorado para diversos fins, contendo áreas cultivadas com cana-de-açúcar; policultura e áreas de Mata Atlântica e Manguezal. A água é usada para

abastecimento público, recepção de efluentes domésticos gerados por 36 municípios e recepção de efluentes industriais e agroindustriais (CPRH, 2008).

O estuário do rio Capibaribe está totalmente inserido na região metropolitana da cidade do Recife e banha, na margem esquerda, os bairros de Casa Forte, Poço, Santana, Jaqueira, Graças, Capunga, Derby, Ilha do Leite, Coelhos, Boa Vista e Recife. Pela margem direita, os bairros de: Monsenhor Fabrício, Bomba Grande, Cordeiro, Torre, Madalena, Ilha do retiro, Ilha Joana Bezerra, São José e Santo Antônio. O estuário é também cortado por várias pontes, como da Torre, Seis de Março, Boa Vista, Duarte Coelho, Princesa Isabel, Maurício de Nassau e a Doze de Setembro, além de vários canais sanitários que desembocam em seu curso (Tabela 3).

Tabela 3 - Canais que aportam na bacia do Rio Capibaribe.

<b>MAIORES</b>	Canal do Caiara	Canal do IPA Canal do ABC Canal do Parnamirim Canal Cavouco	Canal Dona Suzana
	Canal do Valença		Canal Santa Rosa
	Canal do Prado		Canal Derby-Tacaruna
	Canal Santa Edwigem		Canal da Rua Pe. Teófilo
	Canal da 2ª Travessa do Bongi		Twortz
<b>MENORES</b>	Canal da Cohab	Canal da Macaxeira	Canal Golf Club
	Canal do Sport	Canal Nova	Canal Córrego do Jenipapo
	Canal Lins Petit	Descoberta	Canal do Coque
	Canal do Serpro	Canal do Burití	Canal Shopping Plaza Cassa
		Canal do Torreão	Forte

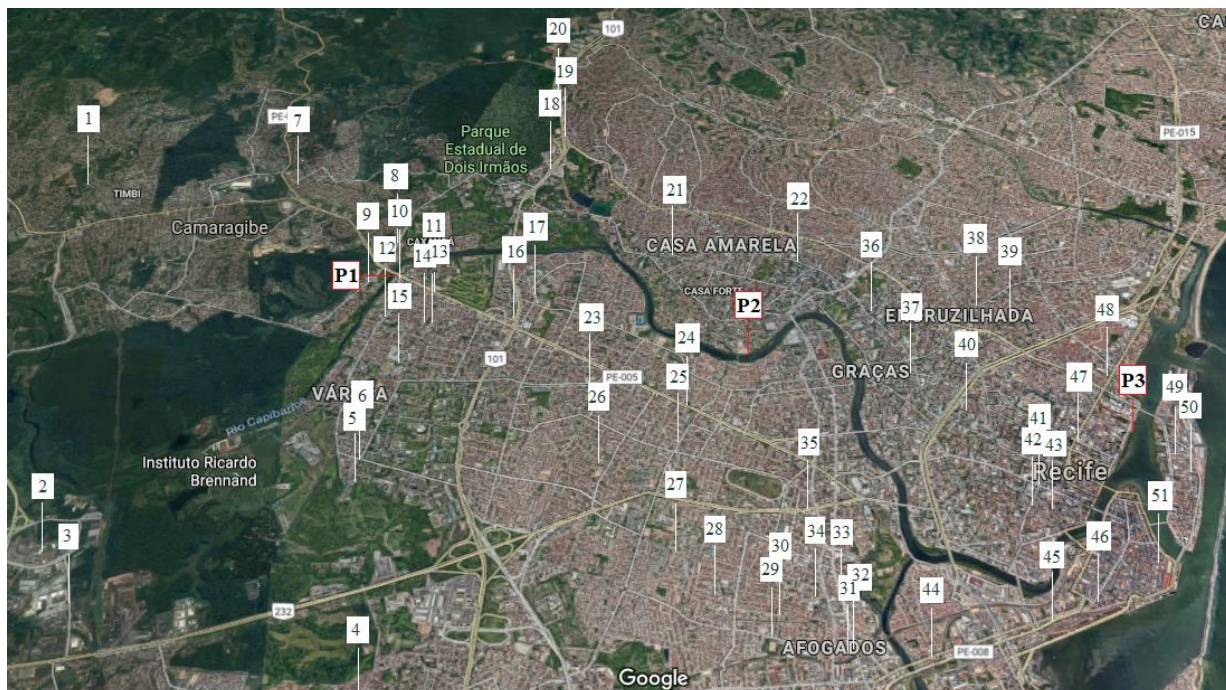
Fonte: CPRH, 2008.

A ocupação e a expansão urbanas da planície do Recife vêm ocorrendo através de aterros, principalmente das áreas alagadas, que eram os espaços naturais das águas. Constata-se que somente as cidades do Recife, Caruaru e Vitória de Santo Antão são parcialmente servidas por rede de coleta extensa, apesar de insuficiente. Desse modo, a solução generalizada em quase todos os municípios é a fossa rudimentar. Quando não existe esse recurso o escoamento é feito diretamente nos rios, lagos e etc. (CONTÉCNICA-PQA/PE, 1998).

Os principais aportes de poluentes no estuário do rio Capibaribe são provenientes de setores industriais de produtos alimentares, minerais não metálicos, têxteis, metalúrgicos, químicos, farmacêuticos/veterinários, sucroalcooleiros, couros, matéria plástica, bebidas, mecânica, material elétrico/comunicação, material de transporte, perfumes/sabões/velas e madeira (CPRH, 2008) (Figura 3) (Tabela 4).



Figura 3 - Indústrias localizadas ao longo da área de estuário no estuário do Rio Capibaribe.



Fonte: Google Maps, 2017.

Tabela 4 - Lista das indústrias localizadas ao longo da área estudada no presente trabalho no estuário Rio Capibaribe. (Adaptada de CPRH, 2011)

Legenda	Nome da Industria	Distância do rio (m)
1	Cerâmica Camaragibe Ltda.	2.215
2	Maxrelé Automação Ltda.	780
3	Bxr Ltda.	1.403
4	Art Bruta Ltda.	310
5	Nordeste/MCT	1.171
6	Metalshop Indústria Ltda.	357
7	C.C.S. Gráfica Ltda.	3.386
8	Sirga Engenharia Ltda.	336
9	Tecnoplast Ltda.	183
10	Campo Total Produtos Agrícolas Ltda.	107
11	Natusense Indústria e Comércio Ltda.	567
12	Lajeiro Gesso Ltda.	935
13	Construtora Andrade Guedes Ltda .	810
14	Raio x Gráfica & Editora	928
15	Tramontina Delta S/A	753
16	Ralquímica Ltda.	1.101
17	Miguel Medeiros Indústria Ltda.	696
18	Construtora Queiroz Galvão S/A	906
19	Coremal - Maia Ltda.	1.562
20	Tanplast Ltda. - ME	2.365
21	Limp Indústria e Comércio Ltda .	563
22	Cartago Ltda.	878
23	Wollk Elevadores Ltda.	1.903

24	Neupel S/A - Indústria e Comércio	799
25	Vpo Perfumaria Ltda.	1.316
26	Colamid do Brasil Ltda.	1.139
27	Koblitz S/A	612
28	Bola Canarina Ltda.	1.472
29	Moinho Limoeiro Ltda.	177
30	Bella Batata Ltda.	69
31	Masterboi Ltda.	315
32	Martins e Silva Química	256
33	Norscent Fragrâncias e Aromas S/A	8
34	al Química	141
35	L. Priori Empreendimentos Ltda.	73
36	TMED. Tecnologia Médica S/A	519
37	R. Maciel e S. Couto Ltda.	574
38	Bessa & Filho Ltda. ortopedia	1.893
39	Alimentos Folia Ltda.	2.159
40	Teccel Indústria e Comércio Ltda.	1.224
41	Indústria e Comércio Mongraf Ltda.	622
42	Gradar Produtos Farmacêuticos Ltda.	437
43	Farmácia das Fórmulas Ltda.	297
44	Prevenção Industrial Ltda.	234
45	Portela Indústria Ltda.	323
46	Afasa Agropastoril Ltda.	469
47	Primo Schincariol Ltda.	478
48	Eteno Plástico Ltda.	286
49	Npap Alimentos Ltda.	228
50	Bunge Alimentos S/A	375
51	São Mateus Frigorífico Ltda.	168

Devido à sua grande importância para a região do grande Recife, o Estuário do Capibaribe tem sido alvo de muitas pesquisas, em sua grande maioria com o objetivo de avaliar a qualidade dos seus compartimentos (água, sedimento e organismos) e quantificar os níveis dos contaminantes presentes nos mesmos (NOBREGA, 2011). Estudos realizados no estuário do rio Capibaribe já apontam a contaminação da água, sedimentos e organismos por coliformes fecais, metais, organoestânicos, hidrocarbonetos, organoclorados, dentre outros (FEITOSA, 1988; SILVA, 2004; CASTRO *et al.*, 2007; FAVROD, 2012; MACIEL *et al.*, 2015 (a,b); MACIEL, 2016, MOURA, 2016).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) em amostras de sedimento do estuário do Rio Capibaribe e identificar os possíveis agentes tóxicos, utilizando embriões de *Danio rerio* como organismos teste.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA da UFRPE o processo de Avaliação e Identificação de Toxicidade (AIT);
- Empregar o procedimento de AIT em amostras ambientais do nordeste Brasileiro;
- Utilizar uma espécie de embriões do *D. rerio* como organismo teste;
- Avaliar a toxicidade dos sedimentos coletados nos estuários do rio Capibaribe através de bioensaios usando o elutriato;
- Verificar os possíveis efeitos tóxicos destas amostras sobre parâmetros subletais;
- Avaliar a qualidade dos sedimentos das amostras ambientais;
- Identificar o (s) grupo (s) de contaminantes responsável (is) pela toxicidade, caso seja observada.



Recife, formada pela confluência do Rio Capibaribe e a Bacia do Pina. Esta última possui uma extensão de aproximadamente 3,6 km e recebe o aporte de várias afluentes, incluindo os Rios Jordao, Pina e Tejipió, além do Capibaribe (SANTOS *et al.*, 2009).

Existem dois canais de acesso ao Porto, sendo que o Canal Sul e o principal, possui cerca de 260 m de largura, 3,4 km de extensão, com profundidade de 12 m (na maré zero); o outro, denominado Canal Norte, possui aproximadamente 1 km de comprimento e 6,5 m de profundidade (na maré zero), sendo utilizado apenas para embarcações de pequeno porte (PORTO DO RECIFE, 2016). Devido a hidrodinâmica do local, todo este complexo emaranhado de águas fluviais e marinhas tem intensa comunicação e, por esta razão, mais recentemente, tem sido designado como sistema estuarino do Rio Capibaribe (SERC) (MACIEL 2015; MACIEL *et al.*, 2015 a,b; MACIEL *et al.*, 2016; SCHETTINI *et al.*, 2016 a;b).

#### 4.2 COLETA DO SEDIMENTO

O sedimento teste foi coletado em três pontos do estuário do Rio Capibaribe (Figura 5), durante as marés de sizígia, próximo a ponte da Caxangá, (P1), Parque Santana (P2) e Prefeitura do Recife (P03) (Figuras 6, 7 e 8 respectivamente) foram realizadas duas coletas, uma no período chuvoso (18/05/2017) e outra no seco (03/12/2017). Em cada ponto da coleta, o sedimento superficial (até 5 cm) foi coletado com uma pá de inox, após a coleta os sedimentos foram transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e comportamento Animal (LECA – UFRPE), onde foram armazenados a 4° C no freezer para conservação dos parâmetros físico-químicos até sua utilização.

No momento da coleta foram aferidas as variáveis temperatura da água (° C), condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e salinidade (ppt) mediante o uso de sonda multiparâmetro YSI modelo 556 MPS e coordenadas geográficas (Tabela 5) em todos os pontos de amostragem, posteriormente variáveis como granulometria e quantidade de matéria orgânica (MO) foram mensurados posteriormente.

Figura 5 - Mapa dos pontos de coleta de sedimento do estuário do Rio Capibaribe nos períodos chuvoso e seco.



Fonte: Google maps, 2017

Figura 6 - Ponto de Coleta próximo a Ponte da Caxangá



Fonte: Autor, 2017.

Figura 7 - Ponto de Coleta próximo a Parque Santana



Fonte: Autor, 2017.

Figura 8 - Ponto de Coleta próximo a Prefeitura do Recife



Fonte: Autor, 2017.

Tabela 5 - Coordenadas geográficas e características dos pontos de amostragem no estuário do Rio Capibaribe.

	Período de coleta	P1 (Pt. da Caxangá)	P2 (Pq. Santana)	P3 (Pref. do Recife)
Latitude		S -8.054932	S -8.042854	S -8.031145
Longitude		W -34.876457	W -34.915844	W -34.956422
Temperatura (° C)	Chuvoso	28,5	28,6	33,1
	Seco	27,1	27,2	34,9
Salinidade (ppt)	Chuvoso	0,5	5,7	9,7
	Seco	3,4	7,8	26,4
Condutividade (µS/cm)	Chuvoso	1062	10,07	19,11
	Seco	1074	13,74	49,72
pH	Chuvoso	7,5	7,4	7,2
	Seco	8,0	8,5	7,5

#### 4.3 PREPARO DO ELUTRIATO

O elutriato (Figura 9) foi preparado segundo a descrição da U.S.EPA (1998), na qual a água deionizada foi adicionada a amostra de sedimento em uma proporção de 1:4 (v:v) com agitação vigorosa por 30 min e em seguida foram mantidas em repouso por 24 horas na geladeira. Após a decantação o sobrenadante foi retirado cuidadosamente por sifonamento. Posteriormente os parâmetros físico-químicos foram medidos (pH, oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e amônia).

Figura 9 - Elutriato preparado das duas coletas



Fonte: Autor, 2017.



#### 4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DOS ORGANISMOS-TESTE

Todos os protocolos envolvendo animais foram submetidos a avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFRPE. Os peixes adultos foram adquiridos em loja comercial de aquarofilia (Aquarium Recife) e mantidos em aquários de 10L, onde fêmeas e machos ficam separados, sob aeração constante, alimentação diária com ração comercial extrusada (40% de proteína bruta) (*ad libitum*), para manutenção destes animais é utilizada água potável da rede de abastecimento municipal, pH corrigido para  $7,0 \pm 1,0$  e temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ \text{C}$ ) no LECA (Biotério Cadastrado na Plataforma CIUCA/CONCEA) onde a manutenção destes aquários é feita semanalmente, com troca total e ajuste da água e sifonamento diário.

Para a obtenção dos ovos para os bioensaios ecotoxicológicos, a reprodução é realizada com as matrizes cultivadas no LECA – UFRPE, para este fim machos e fêmeas são acondicionados em aquários de reprodução de 1,5L numa proporção de 2:1 (OECD, 236) e mantidos por 14 horas no escuro, após 1 hora de claridade, os adultos foram removidos e os ovos retirados com auxílio de uma rede de  $200 \mu\text{m}$ . A triagem e contagem dos ovos é feita com a utilização de uma bandeja de luz, onde os ovos inviáveis (não fecundados ou coagulados) são descartados e os viáveis seguem para os bioensaio.

#### 4.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Os embriões foram alocados em potes estéreis de polietileno com capacidade de 25 mL, mantidos por 96 h em temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro) e pH de  $7,0 \pm 0,5$  para cada grupo experimental e controle foram realizadas três repetições com 10 embriões cada. Os organismos testes não receberam alimento durante a exposição, as soluções foram renovadas diariamente após o período de observação (24, 48, 72 e 96 horas).

Os testes ecotoxicológicos foram primeiramente realizados nas amostras sem manipulações do AIT, sendo estes considerados como Teste Base, a toxicidade foi avaliada através dos parâmetros letais e subletais:

- Coagulação - após 72h;
- Eclosão - 96h;

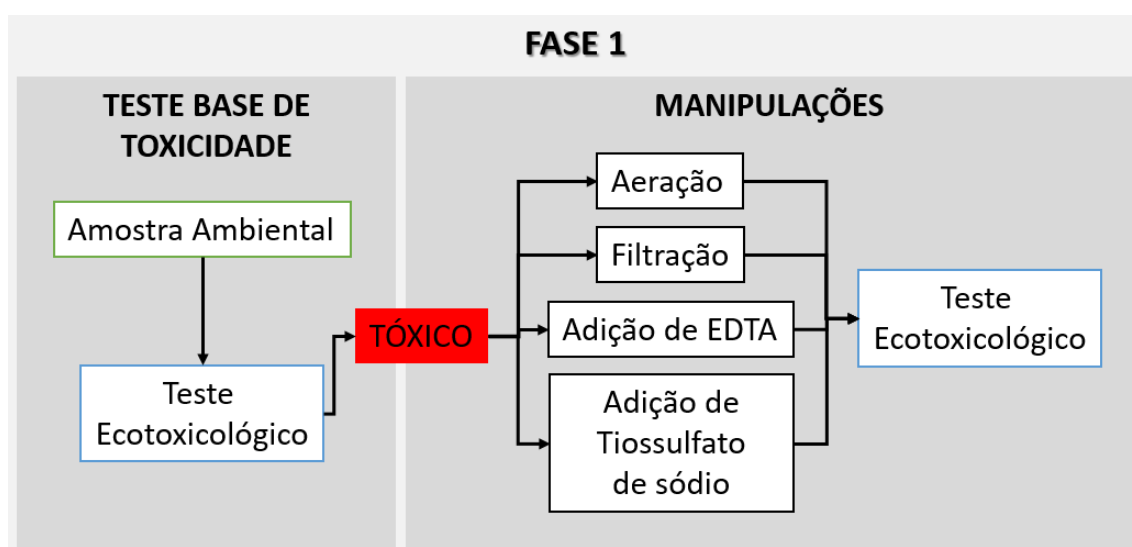
- Mortalidade total - 96h: considerados os ovos coagulados, embriões que se desenvolveram e morreram antes da eclosão e os que morreram após eclodir;
- Teratogenicidade - 96h: má formação da cabeça, cauda e coração, modificação da estrutura da notocorda, escolioses, raquitismo, deformação do saco vitelino e retardo geral de desenvolvimento (LAMMER *et al.*, 2009);
- Frequência cardíaca diária dos embriões (YANG, 2016),

Após a comprovação da toxicidade as amostras tóxicas foram submetidas as manipulações do AIT, onde posteriormente os testes ecotoxicológicos foram novamente realizados com as amostras manipuladas.

#### 4.6 MANIPULAÇÕES DO AIT

Os procedimentos realizados no estudo do AIT, com as amostras de elutriato seguiram as recomendações definidas pela U.S.EPA (U.S.EPA 1991; 1993a; 1996; 2007), utilizando embriões de *D. rerio*. Antes de iniciar os testes, as soluções-estoque de EDTA e Tiosulfato de sódio foram preparados em água destilada. Dentre os sugeridos pela U.S.EPA foram realizados: filtração, aeração, adição de EDTA e Tiosulfato de Sódio.

Figura 10 – Manipulações realizadas na Fase I do AIT do presente estudo.

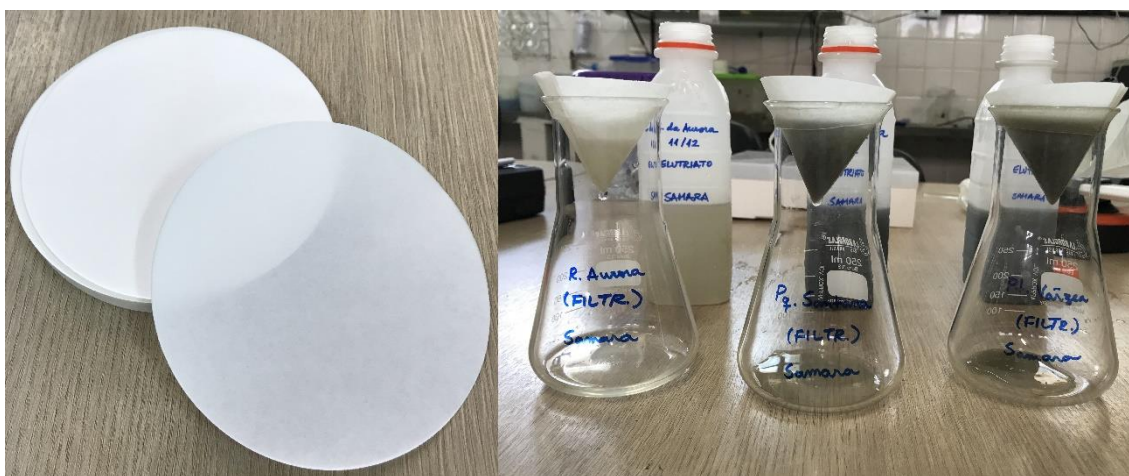


Fonte: Autor, 2018.

#### 4.6.1.1 Manipulação 1: Filtração

Alíquotas do elutriato foram colocadas em cones feitos de filtro de acetato até que toda parte líquida fosse filtrada, ficando apenas as partículas sólidas retidas no filtro (Figura 11), pois os agentes tóxicos podem ficar acumulados nos sedimentos quando adsorvidos as partículas e tornar-se biologicamente disponível a uma variedade de organismos (USEPA, 1991b). Após essa manipulação a solução filtrada foi transferida aos potes de exposição para realização dos bioensaios de ecotoxicologia.

Figura 11 - Filtros de acetato e manipulação dos elutriatos



Fonte: Autor, 2017

#### 4.6.1.2 Manipulação 2: aeração

Foi utilizado um sistema de bombeamento de ar (composto por bomba de aeração, com as mangueiras acopladas aos recipientes) (Figura 12) para que as amostras fossem submetidas à aeração moderada por 60 minutos. Tanto sob aspersão com oxigênio como nitrogênio, além da volatilização ou oxidação, pode ocorrer a remoção de agentes tensoativos da solução. Durante a aspersão, tais agentes se congregam na interface líquido/gás das bolhas de oxigênio ou nitrogênio e são carregadas juntamente com as mesmas para a superfície do líquido aspergido. Quando as bolhas se rompem, tais agentes são depositados e concentrados na superfície e nas paredes do recipiente de aeração (USEPA, 1991). Após este processo, seguiu-se o bioensaio. No início e ao final das manipulações foram verificados o pH e a temperatura das amostras.

Figura 12 - Aeração das amostras de elutriato



Fonte: Autor, 2017.

#### 4.6.1.3 Manipulação 3: Adição de EDTA

Esse agente quelante complexa os metais catiônicos reduzindo a toxicidade do alumínio, cádmio, bário, cobalto, cobre, ferro, chumbo, níquel, manganês, estrôncio e zinco. O EDTA não complexa metais aniônicos e complexa fracamente alguns metais catiônicos como prata, cromo e tálio. O excesso de EDTA na solução pode aumentar sua toxicidade e levar a falsos resultados. Portanto, foi avaliado previamente a sensibilidade dos organismos testados e foi utilizado concentrações que não causam toxicidade (USEPA, 1991, 1992b, 2007; MELO, 2012).

Soluções de EDTA ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas no mesmo dia da realização dos testes de toxicidade. Foram adicionados gradualmente 1,5 mL da solução estoque de EDTA em cada alíquota de elutriato e após um período de 3 horas o bioensaio foi iniciado, no início e ao final das manipulações serão verificados o pH e a temperatura das amostras.

#### 4.6.1.4 Manipulação 4: Adição de Tiosulfato de Sódio

A adição de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) tem por finalidade detectar a toxicidade de substâncias oxidantes como cloro, ozônio, bromo e íons de manganês, além de reduzir a biodisponibilidade de alguns metais catiônicos, como cádmio, cobre e

mercúrio. Assim como o EDTA o tiosulfato de sódio em determinadas concentrações pode ser tóxico para o organismo teste, portanto, testes preliminares de sensibilidade foram realizados e concentrações que não produzam efeito adverso foram utilizadas nas manipulações (USEPA; 1991, 1992b).

Foram adicionados 1,8 mL da solução estoque de tiosulfato de sódio (2000 mg L<sup>-1</sup>, preparadas no mesmo dia da execução dos testes) e após um período de 1 hora o bioensaio será realizado, no início e ao final das manipulações serão verificados o pH e a temperatura das amostras.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot 11.0, com nível de significância de 5% para todas as análises. Os parâmetros foram analisados quanto à normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variâncias ou heterodasticidade pelo teste de medianas Levene. A ANOVA *oneway* (ANOVA unifatorial) foi utilizada para os dados que apresentaram uma distribuição normal ou homogeneidade de variância. Quando os testes apresentaram diferenças significativas foi realizada a comparação das médias das manipulações, em relação a ao teste de caracterização, pelo teste Dunnett a 5% probabilidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO GRANULOMETRICA

As amostras P1, P2 e P3 de sedimentos coletadas no estuário do rio Capibaribe para preparação dos elutriatos, demonstraram características sedimentológicas distintas (Tabela 6). O P3, em relação aos outros pontos, apresentou a maior fração de sedimentos arenosos e a menor fração de matéria orgânica, o oposto ocorreu na análise dos sedimentos finos (argila + silte) e percentual de matéria orgânica foi maior no P1 seguido por P2.

Tabela 6 – Análises granulométricas dos sedimentos coletados nos pontos de amostragem do rio Capibaribe.

Pontos de amostragem	P1	P2	P3
Parâmetros avaliados	(Ponte da Caxangá)	(Parque Santana)	(Prefeitura do Recife)
<b>Fração de Areia</b>	5,5%	12,2%	20,8
<b>Fração de Finos</b>	44,5%	37,8%	29,2
<b>Matéria Orgânica</b>	31,6%	23,9%	12,8%

### 5.2 TESTE BASE

As amostras também apresentaram distinção em relação a toxicidade, onde, no P1 a amostra apresentou toxicidade elevada em quase todos os parâmetros analisados no período chuvoso e no período seco só manifestou toxicidade na teratogenicidade. O P2 durante o período chuvoso foi ressaltado a toxicidade apenas nos parâmetros subletais e no seco não foi toxica apenas no parâmetro de coagulação. O P3 apresentou toxicidade similar nos períodos, sendo toxica nos parâmetros subletais, frequência cardíaca e teratogenicidade, em ambos períodos. Como descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do teste base ecotoxicológico realizado com os elutriatos dos dois períodos de coleta de sedimento do estuário do rio Capibaribe

Pontos de Coleta	P1		P2		P3	
Período de Coleta	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco
<b>Coagulação</b>	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<b>Eclosão</b>	T	NT	NT	T	NT	NT
<b>Mortalidade Total</b>	T	NT	NT	T	NT	NT
<b>Teratogenicidade</b>	T	T	T	T	T	T
<b>Bat. Cardíacos</b>	T	NT	T	T	T	T

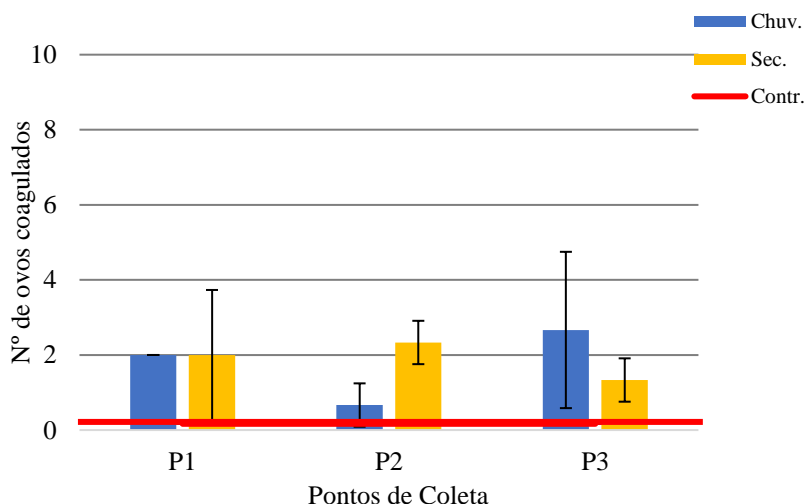
T= efeito significativo de toxicidade; NT= amostra não toxica

A coagulação observada no teste base, com os elutriatos das amostras coletadas no período chuvoso, foi possível observar que os embriões expostos durante 72h não apresentaram diferença significativa (ANOVA,  $F = 2,91$ ;  $P = 0,101$ ) em todos os pontos (P1, P2 e P3) em relação ao controle (Gráfico 1), mas observa-se que os pontos P3 seguido pelo P1 e P2 apresentaram maior coagulação que o controle, apresentando os valores de  $3,0 (\pm 0)$ ;  $2,3 (\pm 0,6)$  e  $0,6 (\pm 2,1)$  respectivamente (Gráfico 1).

Nas amostras do período seco, foi possível observar que os organismos expostos não apresentaram diferença significativa (ANOVA,  $F = 3,48$ ;  $P = 0,070$ ) quanto à coagulação nos três pontos escolhidos, em relação ao controle (Gráfico 1) mas observa-se que os pontos P2 seguido pelo P1 e P3 apresentaram maior coagulação que o controle, apresentando os valores de  $2,3 (\pm 0,5)$ ;  $2,0 (\pm 1,7)$  e  $1,3 (\pm 0,5)$  ovos coagulados respectivamente.

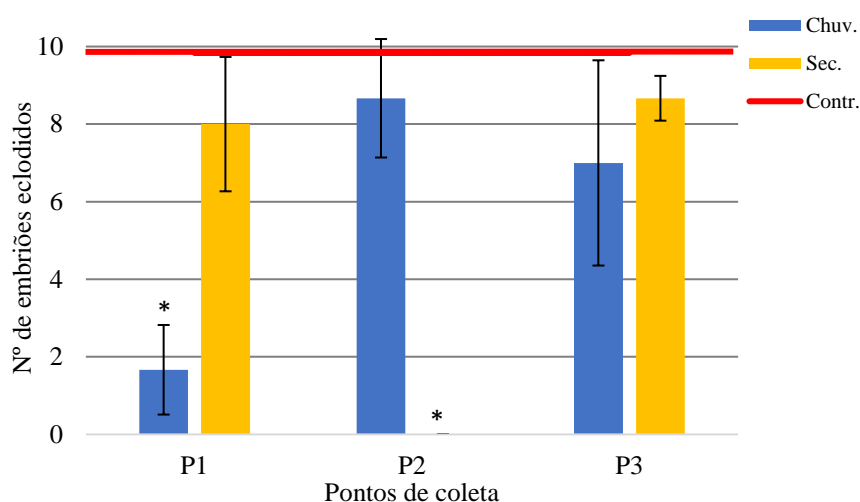
Observa-se que o P1 apresentou médias muito próximas durante o período seco e chuvoso, demonstrado que as estações não influenciam diretamente na toxicidade do sedimento quando avaliado pela coagulação dos ovos. No P2 nota-se um aumento na coagulação dos ovos no período seco quando comparado ao período anterior sugerindo que as características do período seco tornam os sedimentos deste ponto mais tóxico ou torne os contaminantes mais disponíveis no ambiente. No P3 ocorre o inverso do ponto anterior, este ponto apresentou um número médio de coagulações maior no período chuvoso, reduzindo este valor no período seguinte.

Gráfico 1 – Coagulação média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* expostos por 72h aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante os períodos seco e chuvoso.



A eclosão dos embriões após 96h de exposição as amostras do período chuvoso, apenas o P1 (Dunnett,  $q' = 5,91$ ;  $P < 0,50$ ) se mostrou tóxico neste parâmetro, apresentando diferenças significativas (ANOVA,  $F = 13,85$ ;  $P = 0,002$ ) em relação ao controle, os pontos P2 e P3 não apresentaram diferenças significativas, porém observa-se uma redução na eclosão. Em relação aos ovos expostos as porções do período seco, o que apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 73,60$ ;  $P = < 0,001$ ) em relação ao controle foi o P2 (Dunnett,  $q' = 13,42$ ;  $P < 0,50$ ), o P1 e P3 não apresentaram diferenças significativas, porém o número médio de ovos eclodidos foi inferior à média encontrada pelo grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Eclosão média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões *de D. rerio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferenças significativas)

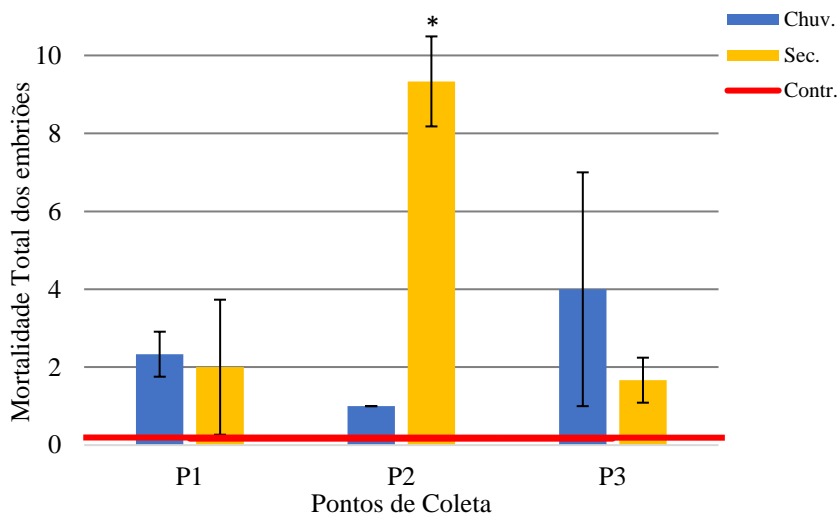


Na avaliação do período chuvoso a mortalidade total observada nos três pontos não apresentou diferenças significativas (ANOVA,  $F = 3,25$ ;  $P = 0,081$ ) (Gráfico 3).

O ponto P2 durante o período seco (Dunnett,  $q' = 10,58$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 44,26$ ;  $P = < 0,001$ ) em relação ao controle, os pontos P1 e P3 não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle (Gráfico 3).



Gráfico 3 – Mortalidade total média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. reio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferenças significativas)



Foi observado efeitos teratogênicos nos três pontos coletada no período chuvoso, apresentando diferenças significativas (ANOVA,  $F = 1e40$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao controle. O mesmo ocorreu no período seguinte (ANOVA,  $F = 1e40$ ;  $P < 0,001$ ) (Gráfico 4). O mais frequente efeito teratogênico observado foi o retardo no desenvolvimento (*delay*) observado em todos os embriões expostos aos elutriatos dos 3 três pontos nos dois períodos (Figura 13).

Gráfico 4 – Teratogenicidade média ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* após 96h expostos aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso e seco. (\* = diferença significativa)

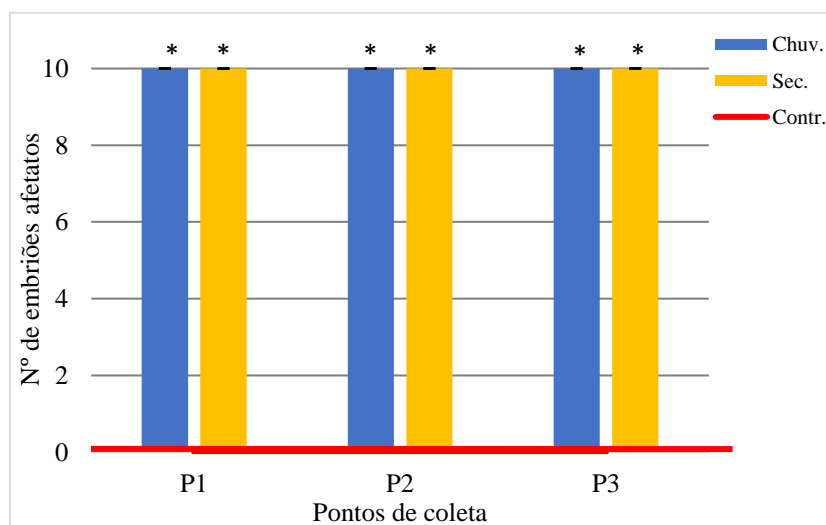
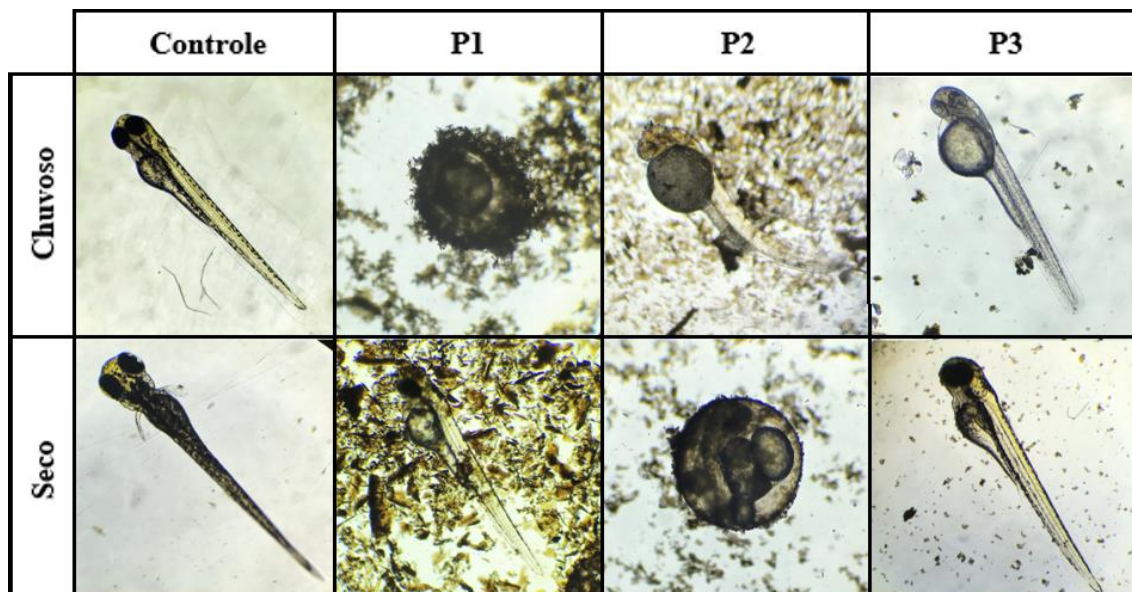


Figura 13 – Desenvolvimento dos embriões após 96h expostos aos elutriatos dos períodos chuvoso e seco.

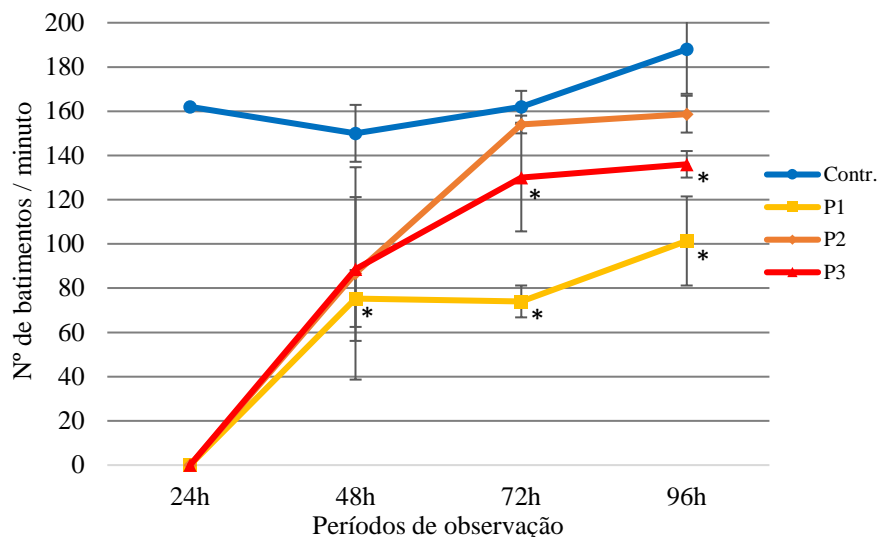


Os batimentos cardíacos dos embriões expostos a coleta do período chuvoso apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 4920,75$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao controle, nos pontos P1 (Dunnett,  $q' = 99,20$ ;  $P > 0,50$ ), P2 (Dunnett,  $q' = 99,20$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 99,20$ ;  $P > 0,50$ ) nas primeiras 24h de exposição. Em 48h de exposição os três pontos não apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 3,72$ ;  $P = 0,061$ ) (Gráfico 5).

Após 72h de exposição, os pontos P1 (Dunnett,  $q' = 8,29$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 3,01$ ;  $P > 0,50$ ) exibiram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 28,02$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao controle, mas o P2 não apresentou diferenças significativas, mas foi o ponto que obteve maior frequência nessa avaliação.

Em 96h de exposição, o P2 é o ponto que mais se aproximou da média de batimentos cardíacos observada no grupo controle, os pontos P3 (Dunnett,  $q' = 4,98$ ;  $P > 0,50$ ) e P1 (Dunnett,  $q' = 8,29$ ;  $P > 0,50$ ), mostraram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 25,56$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao controle, porém foram valores inferiores ao controle.

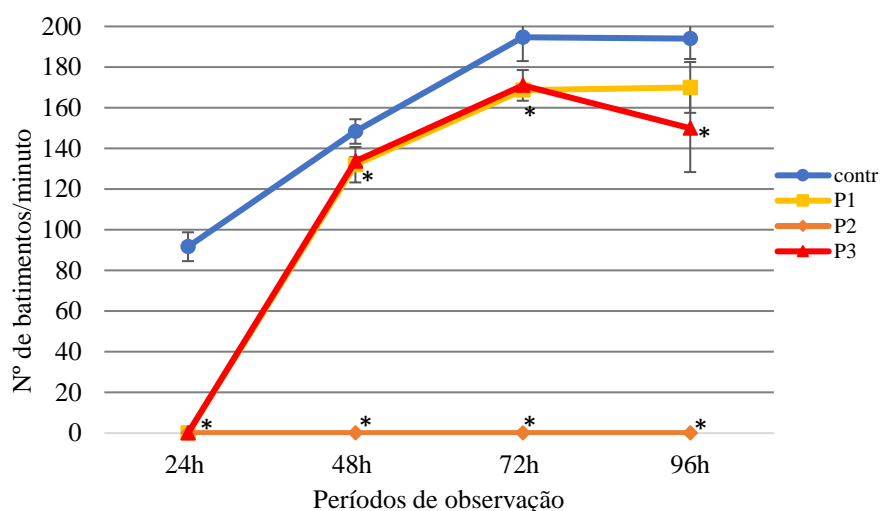
Gráfico 5 – Batimentos cardíacos médios ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* durante as 96h de exposição aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período chuvoso. (\* = diferenças significativas)



Os batimentos cardíacos dos embriões expostos as amostras do período seco apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 500,83$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao controle nos pontos P1 (Dunnett,  $q' = 31,65$ ;  $P > 0,50$ ), P2 (Dunnett,  $q' = 31,65$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 31,65$ ;  $P > 0,50$ ) nas primeiras 24 horas. Em 48h o P1 (Dunnett,  $q' = 3,70$ ;  $P > 0,50$ ), P2 (Dunnett,  $q' = 36,64$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 3,33$ ;  $P > 0,50$ ) continuam com diferenças significativas (ANOVA,  $F = 495,24$ ;  $P < 0,001$ ) (Gráfico 6).

Em 72h de exposição a frequência cardíaca dos embriões continua mostrando diferenças significativas (ANOVA,  $F = 494,84$ ;  $P < 0,001$ ) no P1 (Dunnett,  $q' = 4,55$ ;  $P > 0,50$ ), P2 (Dunnett,  $q' = 34,09$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 4,14$ ;  $P > 0,50$ ) em relação ao controle, porém no P3 observa-se diferença em relação ao controle por não apresentar batimentos cardíacos, pois os embriões não desenvolveram o coração neste período. Os pontos P2 (Dunnett,  $q' = 17,66$ ;  $P > 0,50$ ) e P3 (Dunnett,  $q' = 4,00$ ;  $P > 0,50$ ) em 96h de análises da frequência cardíaca continuaram significativamente diferentes (ANOVA,  $F = 2,18$ ;  $P < 0,001$ ) do controle, porém o P1 (Dunnett,  $q' = 34,09$ ;  $P > 0,50$ ) obteve um aumento nos batimentos cardíacos dos embriões e não apresentou mais diferenças significativas em relação ao controle.

Gráfico 6 – Batimentos cardíacos médios ( $\pm$  desvio padrão) dos embriões de *D. rerio* durante as 96h de exposição aos elutriatos obtidos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe durante o período seco. (\* = diferenças significativas)



De acordo com os resultados observados na caracterização, todas as amostras coletadas no período chuvoso e seco são tóxicas para os embriões de *D. rerio* variando a toxicidade nos *endpoints* avaliados, mediante a isto todos os pontos foram submetidos a avaliação do AIT.

### 5.3 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT)

Não obstante aos resultados obtidos no teste base, o procedimento de AIT foi aplicado para identificar os compostos ou classes de compostos tóxicos presentes nos sedimentos, possibilitando a tomada de decisões conscientes a implementação de novas medidas de tratamentos e limiares, objetivando a redução da toxicidade a níveis aceitáveis e não prejudiciais a biota do local em questão.

#### 5.3.1 Ponto 1

Localizado próximo a ponte da Caxangá, este ponto foi tóxico em todos os parâmetros analisados exceto o de coagulação durante o período chuvoso. Dentre as quatro manipulações que o elutriato foi submetido após a caracterização, duas (filtração e adição de EDTA) foram mais eficientes neste ponto durante o período chuvoso reduzindo a toxicidade na maioria dos parâmetros analisados (Gráfico 7)

Em relação ao número de ovos coagulados até 72h, não houve diferença significativa em nenhuma das manipulações. Na análise dos ovos eclodidos após 96h de as manipulações que apresentaram diferença significativa (ANOVA,  $F = 16,844$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao teste base foram a, filtração (Dunnett,  $q' = 5,77$ ;  $P < 0,50$ ), aeração (Dunnett,  $q' = 4,33$ ;  $P < 0,50$ ) e adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 3,17$ ;  $P < 0,50$ ).

No que se refere a mortalidade após 96h nenhuma das manipulações apresentaram diferença significativa. No parâmetro da teratogenicidade os tratamentos com Filtração (Dunnett,  $q' = +inf$ ;  $P < 0,50$ ) e adição de EDTA (Dunnett,  $q' = +inf$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F < 1e40$ ;  $P < 0,001$ ) em comparação com o teste base, reduzindo significativamente a teratogenicidade dos embriões, o efeito teratogênico mais observado tanto na aeração quanto na adição de tiosulfato foi o *delay* (Figura 14).

Gráfico 7 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)

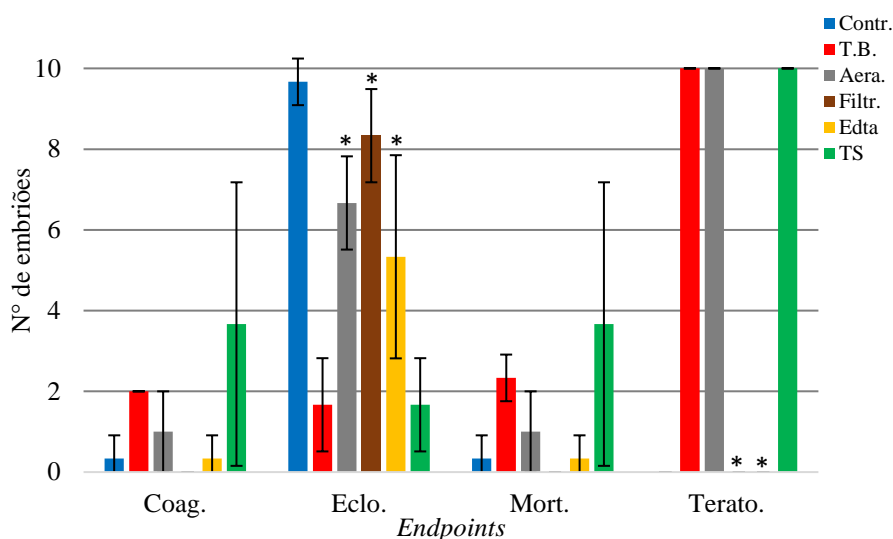
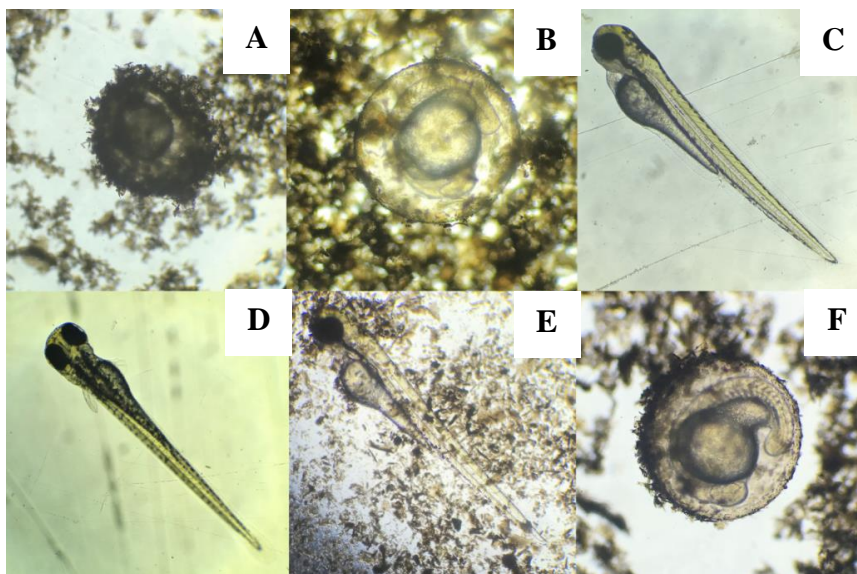


Figura 14 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P1/chuvoso após 96h.

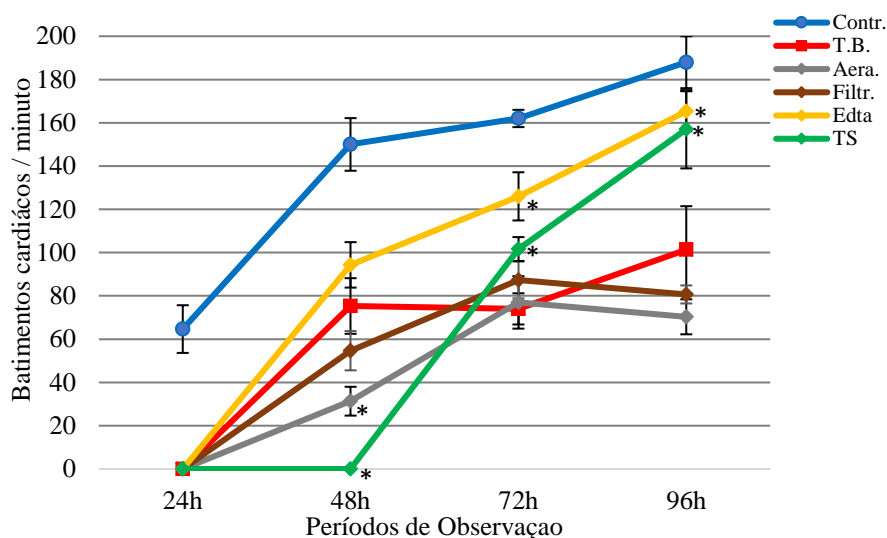


A: Teste Base, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

As frequências cardíacas durante a exposição ao elutriato do período chuvoso apresentaram diferenças significativas em relação ao teste base, variando essa significância no decorrer dos dias avaliados (Gráfico 8). Após 24h de exposição nenhum dos tratamentos foi significativamente diferente (ANOVA,  $F = 103,40$ ;  $P > 0,050$ ), em 48h de exposição os tratamentos com Aeração (Dunnett,  $q' = 5,63$ ;  $P < 0,50$ ) e Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 9,63$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas, o com adição de EDTA não apresentou diferença significativa, porém dentre as manipulações foi a que apresentou a maior média de frequência cardíaca sendo superior ao teste de caracterização base.

Após 72h de exposição o elutriato com o tratamento de adição EDTA continuou apresentando a maior média de frequência cardíaca entre os tratamentos, sendo desta vez significativamente diferente do teste base (Dunnett,  $q' = 7,42$ ;  $P < 0,50$ ), o tratamento com adição de Tiosulfato de sódio foi o que apresentou maior frequência cardíaca após o com EDTA, sendo diferente significativamente (Dunnett,  $q' = 3,95$ ;  $P < 0,50$ ) do teste base. No final do bioensaio, 96h de manipulação, o elutriato com adição de EDTA foi o que apresentou maior redução de toxicidade, apresentando uma frequência cardíaca mais próxima ao controle e significativamente (Dunnett,  $q' = 5,94$ ;  $P < 0,50$ ) superior que o teste base, seguida pelo tratamento com Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 5,17$ ;  $P < 0,50$ ).

Gráfico 8 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



O ponto 1, no período seco se mostrou menos tóxico do que no período chuvoso e nos parâmetros letais não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, mas nos parâmetros subletais foi observado um aumento na teratogenicidade e alteração na frequência cardíaca, mediante a isto ele também foi submetido aos tratamentos do AIT (Gráfico 9).

Assim como foi observado no teste base onde este ponto só apresentou toxicidade quando avaliado pelos parâmetros subletais, as manipulações só se mostram eficazes nos *endpoints* subletais. Na avaliação da teratogenicidade da amostra os tratamentos físicos de Filtração (Dunnett,  $q' = 11,33$ ;  $P < 0,50$ ) e Aeração (Dunnett,  $q' = 6,04$ ;  $P < 0,50$ ) e os químicos com adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 7,18$ ;  $P < 0,50$ ) e Tiosulfato de Sódio (Dunnett,  $q' = 5,29$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 36,16$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao teste base, reduziram de 10 indivíduos com características teratogênicas (Figura 15) para 0; 4,6; 3,6 e 5,3 respectivamente.

Gráfico 9 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)

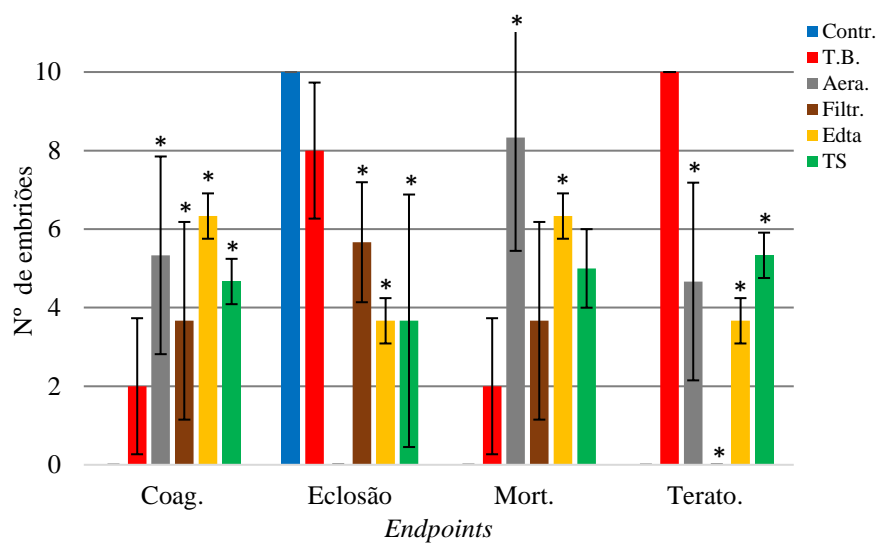
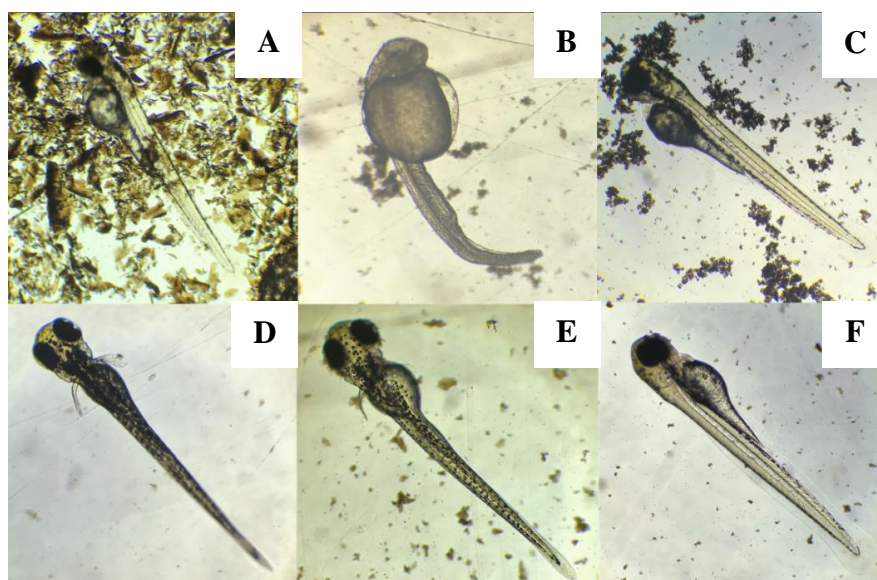


Figura 15 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P1/seco após 96h.



A: Teste de caracterização, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

As manipulações realizadas no elutriato do período seco apresentaram diferenças significativas em relação ao teste base do ponto quanto a frequência cardíaca (Gráfico 10). Após 24h de exposição nenhum dos tratamentos foi significativamente diferente do

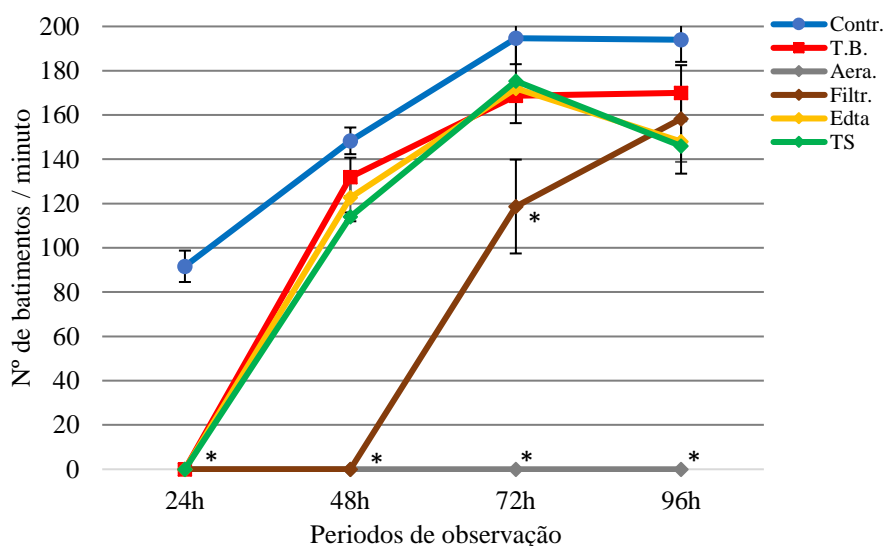


teste base (ANOVA,  $F = 500,83$ ;  $P > 0,050$ ), em 48h de exposição os tratamentos com Aeração (Dunnett,  $q' = 29,38$ ;  $P < 0,50$ ), Filtração (Dunnett,  $q' = 29,38$ ;  $P < 0,50$ ) e Tioissulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 4,00$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 454,22$ ;  $P > 0,050$ ).

Após 72h de exposição o elutriato com a manipulação de Tioissulfato de sódio e EDTA não apresentaram diferenças significativas, mas suas frequências cardíacas superaram o teste base se aproximando a média do grupo controle, se mostrando eficiente na redução da toxicidade neste parâmetro, a manipulação com filtração nota-se uma tendência ao aumento dos batimentos cardíacos, enquanto o tratamento com aeração está estagnado pois os embriões não apresentam coração.

Em 96h de manipulação, os tratamentos com adição de Tioissulfato de sódio e EDTA, apresentaram uma queda na frequência cardíaca e o tratamento com a Filtração aumentou, o tratamento com Aeração (Dunnett,  $q' = 20,31$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferenças significativas (ANOVA,  $F = 135,69$ ;  $P > 0,050$ ) em relação a caracterização.

Gráfico 10 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 1 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



### 5.3.2 Ponto 2

O ponto de coleta 2, localizado próximo ao Parque Santana, exibiu toxicidade apenas nos parâmetros subletais durante o período chuvoso, mas no período seco ocorreu

o aumento da toxicidade do ambiente, não sendo tóxico apenas no parâmetro que avaliou as coagulações dos embriões.

Quando submetido as manipulações do AIT, as amostras do período chuvoso no parâmetro que avaliou a coagulação dos ovos após 72h, as manipulações que reduziram a quantidade média de ovos coagulados foram a Filtração, adição de EDTA e Tiossulfato de sódio apresentando médias iguais de 0,33, porém estas diferenças não foram estatisticamente significantes. O elutriato submetido ao tratamento com Aeração apresentou diferença significativa (Dunnett,  $q' = 5,66$ ;  $P < 0,50$ ) em relação ao teste base, contudo este tratamento aumentou o número de ovos coagulados (Gráfico 11).

Em relação a eclosão dos ovos após 96h de manipulação, os tratamentos de Filtração, adição de EDTA e Tiossulfato de Sódio, foram os que apresentaram maiores médias de eclosões 9,67; 8,00 e 6,33 respectivamente, sendo superiores ao teste base, porém não foram diferenças significativas. O elutriato que passou pelo tratamento da Aeração apresentou diferença significativa (Dunnett,  $q' = 4,18$ ;  $P < 0,50$ ) em relação ao teste base, mas a média 4,33 foi inferior a apresentada no teste base (8,67). Na análise da mortalidade total, a manipulação em que se teve diferença significativa foi a Aeração (Dunnett,  $q' = 5,42$ ;  $P < 0,50$ ), porém neste tratamento foi observado média superior de mortalidade em relação ao teste base.

Assim como nos parâmetros analisados anteriormente, o tratamento com Aeração se distingue dos demais apresentando um resultado negativo na redução da toxicidade no que diz respeito a teratogenicidade dos elutriatos. Os tratamentos de Filtração (Dunnett,  $q' = +inf$ ;  $P < 0,50$ ), adição de EDTA (Dunnett,  $q' = +inf$ ;  $P < 0,50$ ) e Tiossulfato de sódio (Dunnett,  $q' = +inf$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F < 1e40$ ;  $P < 0,001$ ) em comparação com a caracterização do ponto, reduzindo significativamente a teratogenicidade neste ponto (Figura 16).

Gráfico 11 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 2 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)

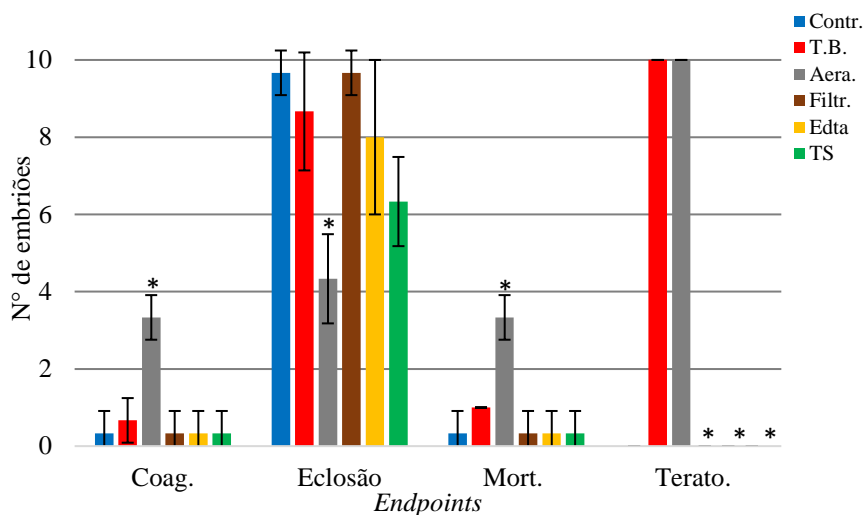


Figura 16 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P2/chuvoso após 96h.



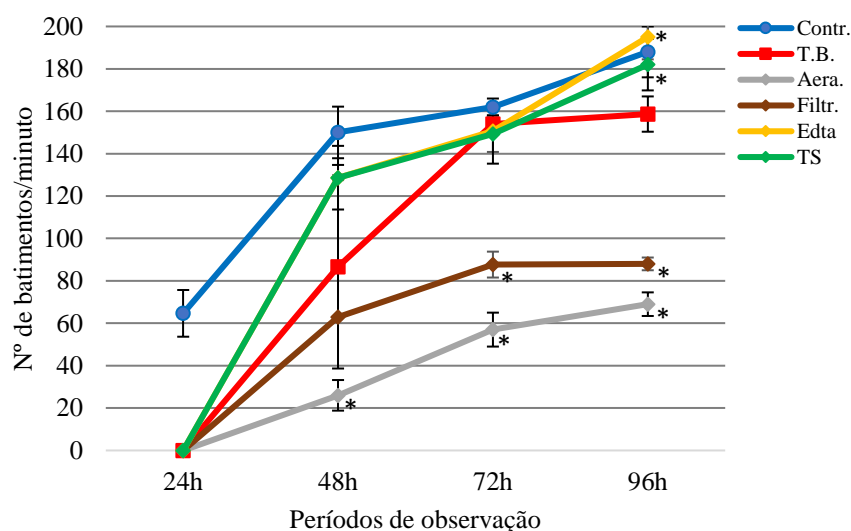
A: Teste de caracterização, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

Quanto a frequência cardíaca, após 24h de exposição das manipulações foi significativamente diferente do teste base (ANOVA,  $F = 103,40$ ;  $P > 0,050$ ), em 48h de

exposição o tratamento com Aeração (Dunnett,  $q' = 3,48$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença significativa porém inferior em comparação ao teste base, o elutriato submetido ao tratamento com adição de EDTA e o com adição de Tiosulfato de sódio não apresentaram diferenças significativas, porém dentre os tratamentos foram os que apresentaram a maiores médias de frequência cardíaca (Gráfico 12).

Na contagem dos batimentos em 72h as manipulações com aeração (Dunnett,  $q' = 14,07$ ;  $P < 0,50$ ) e filtração (Dunnett,  $q' = 9,62$ ;  $P < 0,50$ ) foram as que apresentaram diferenças significativa em relação ao teste base. Em 96h de manipulação, as quatro manipulações apresentaram diferenças significativas, as manipulações físicas com Aeração (Dunnett,  $q' = 11,88$ ;  $P < 0,50$ ) e Filtração (Dunnett,  $q' = 9,37$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram a média inferior de batimentos em relação ao teste base e consequentemente ao controle, as manipulações químicas com adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 4,82$ ;  $P < 0,50$ ) e adição de Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 3,09$ ;  $P < 0,50$ ). Demonstrando que neste parâmetro as manipulações com adição de EDTA e adição de Tiosulfato de sódio são mais eficientes na redução de toxicidade no P2 no período chuvoso.

Gráfico 12 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 2 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



O elutriato do P2 do período seco, quando submetido as manipulações do AIT, a com adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 12,60$ ;  $P < 0,50$ ) e adição de Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 5,66$ ;  $P < 0,50$ ) apresentam diferenças significativas (ANOVA,  $F < 8,76$ ;  $P$

< 0,001) em relação ao teste base aumentando a quantidade média de coagulação após 72h de exposição aos elutriatos manipulados.

No parâmetro que avaliou a eclosão dos ovos após 96h de manipulação, dentre os quatro tratamentos utilizados no AIT os que aumentaram quantidade média de ovos eclodidos foram a Aeração e Filtração, apresentando médias de 6,33 e 3 respectivamente porem só o tratamento com Aeração (Dunnett,  $q' = 6,33$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença estatisticamente significativa (ANOVA,  $F < 21,80$ ;  $P < 0,001$ ) (Gráfico 13).

Na análise da mortalidade total, nenhum dos tratamentos realizados apresentou diferenças significas (ANOVA,  $F < 75,15$ ;  $P < 0,001$ ) na redução da mortalidade,

As manipulações com Filtração (Dunnett,  $q' = 9,18$ ;  $P < 0,50$ ), adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 9,18$ ;  $P < 0,50$ ) e Tiossulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 9,18$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F < 35,0$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao teste base, reduzindo a teratogenicidade do ponto, destacando nesse parâmetro as manipulações com filtração que reduziu a 0 o número de indivíduos com efeitos teratogênicos no tratamento com adição de EDTA nota-se a média igual ao tratamento com filtração, porem este número se dá por todos os ovos expostos terem coagulado antes de apresentar algum efeito teratogênico no embrião, se igualando a média encontrada no grupo controle (Figura 17).

Gráfico 13 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 2 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)

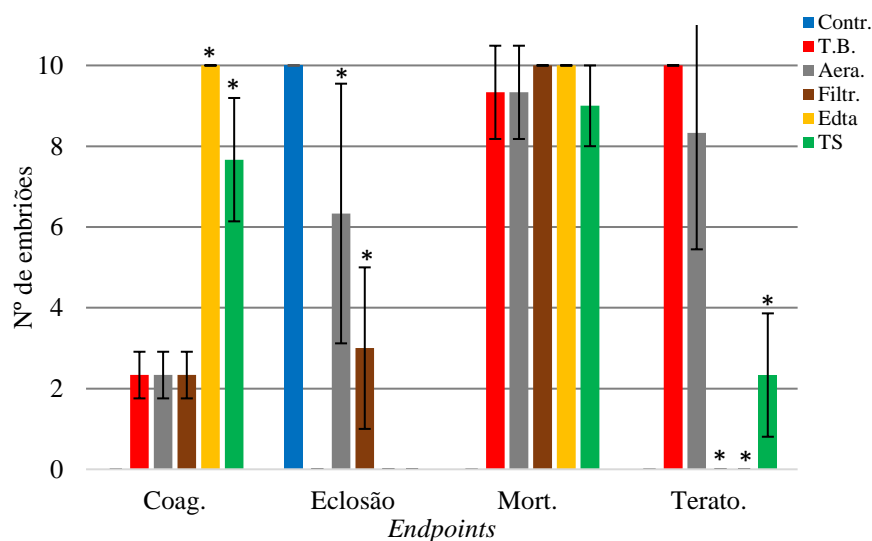
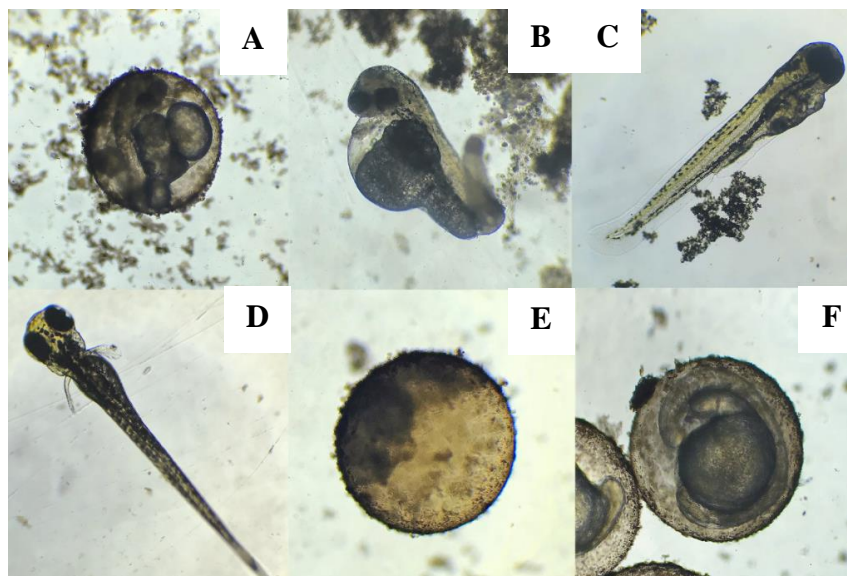


Figura 17 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P2/seco após 96h.



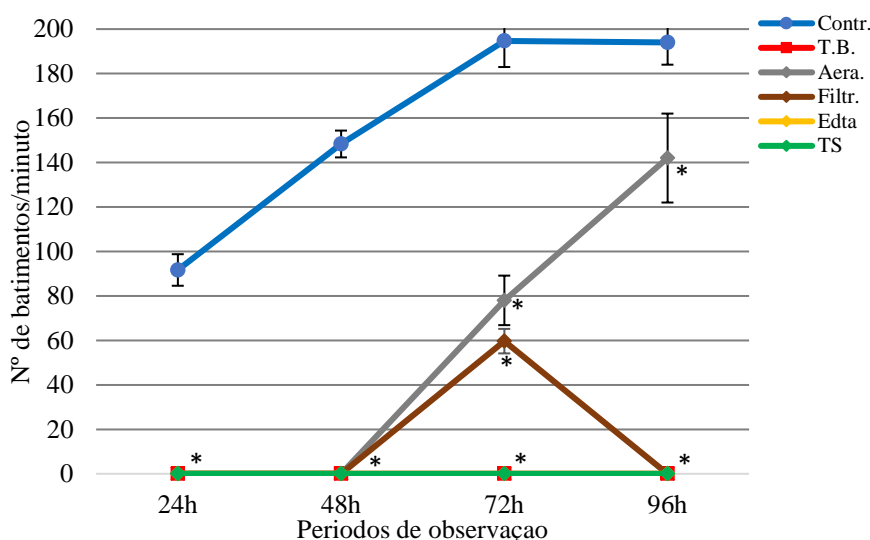
A: Teste de caracterização, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

Após 24h de exposição nenhum das manipulações foi significativamente diferente do teste base (ANOVA,  $F = 500,82$ ;  $P > 0,050$ ), em 48h de exposição os tratamentos continuam sem apresentar diferenças significativas (ANOVA,  $F = 1816,74$ ;  $P > 0,050$ ) em relação ao teste base (Gráfico 14).

Em 72h de exposição os elutriatos com o tratamento com aeração (Dunnett,  $q' = 13,70$ ;  $P < 0,50$ ) e filtração (Dunnett,  $q' = 10,48$ ;  $P < 0,50$ ) foram os que apresentaram diferença significativa em relação ao teste base, apresentando um aumento na frequência cardíaca dos embriões.

O tratamento com Aeração (Dunnett,  $q' = 19,05$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou a maior média de batimentos em relação ao teste base, sendo este aumento significativamente diferente (ANOVA,  $F = 280,68$ ;  $P > 0,050$ ) em relação ao teste base, os tratamentos com Filtração e adição de EDTA, adição de Tiosulfato de sódio não apresentam diferenças significativas.

Gráfico 14 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 2 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



### 5.3.3 Ponto 3

O ponto de coleta 3, localizado próximo a Prefeitura do Recife, nos resultados do teste base não apresentou diferenças significativas quanto aos *endpoints* letais. Nos *endpoints* subletais, frequência cardíaca e teratogenicidade apresentou diferenças significativas em relação ao controle nos dois períodos.

Na avaliação do AIT, no que diz respeito a coagulação dos ovos após 72h expostos ao elutriato do P3 coletado no período chuvoso, nenhuma das quatro manipulações apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 2,48$ ;  $P = 0,092$ ) (Gráfico 15).

Em relação a eclosão dos ovos após 96h, nenhum tratamento apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 1,67$ ;  $P = 0,217$ ), mas os tratamentos que apresentaram médias superiores de eclosão ao resultado apresentando no teste base foram os tratamentos de Aeração (9,0), Filtração (8,6) e adição de EDTA (8,33).

Os resultados obtidos durante a análise da mortalidade total, continuam seguindo o padrão de resultados dos outros parâmetros onde as manipulações não apresentam diferenças significativas (ANOVA,  $F = 1,65$ ;  $P = 0,219$ ).

Os tratamentos com Filtração (Dunnett,  $q' = 29,0$ ;  $P < 0,50$ ), adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 29,0$ ;  $P < 0,50$ ) e adição de Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 29,0$ ;  $P < 0,50$ )

0,50) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 456,60$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao teste base do ponto na redução da teratogenicidade, e o tratamento com Aeração que nos outros parâmetros partia reduzindo as medias, neste não se mostrou eficiente (Figura 18)

Gráfico 15 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas no elutriato do Ponto 3 do período chuvoso comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas).

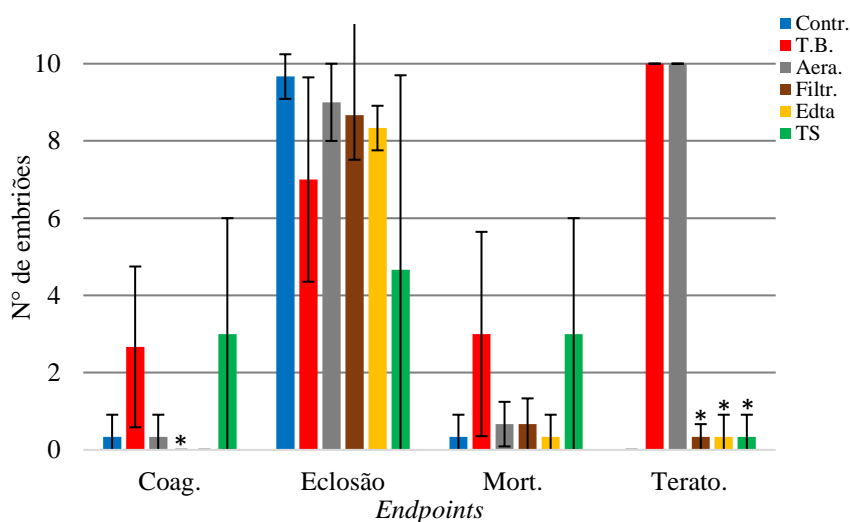
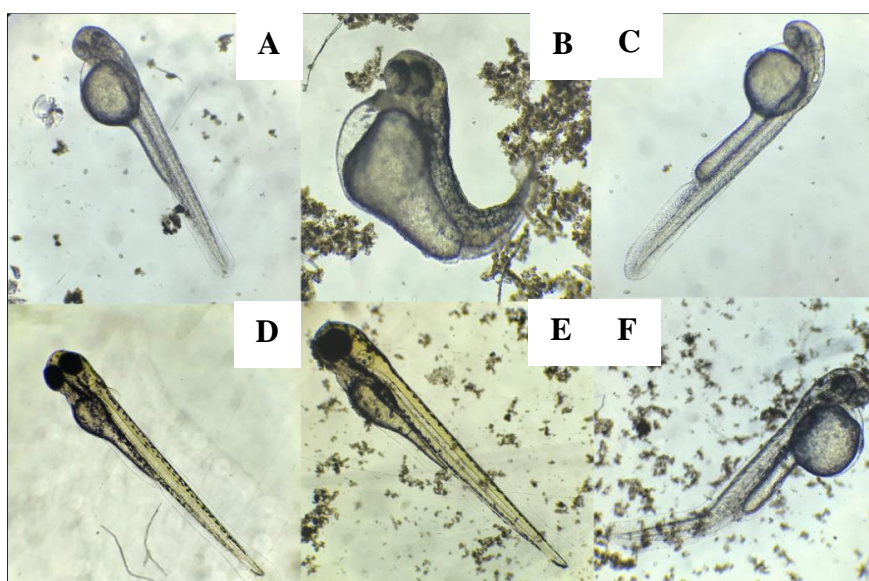


Figura 18 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P3/chuvoso após 96h.



A: Teste de caracterização, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

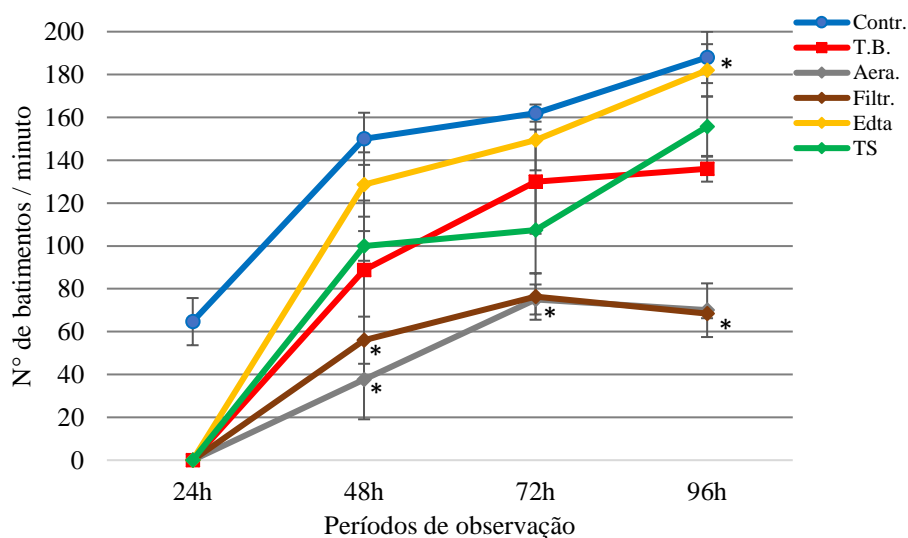


A frequência cardíaca apresentada nas manipulações em 24h não apresentou diferenças significativas (ANOVA,  $F = 103,40$ ;  $P < 0,001$ ). A manipulação com Aeração (Dunnett,  $q' = 3,47$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença em relação ao teste base. Após 48h, os tratamentos com Filtração, adição de EDTA e adição de Tiosulfato de sódio não apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 16,69$ ;  $P < 0,001$ ), porém os tratamentos com EDTA e Tiosulfato de sódio obtiveram batimentos cardíacos por minuto superiores ao teste base (Gráfico 16).

Em 72h de exposição o elutriatos com Aeração (Dunnett,  $q' = 4,45$ ;  $P < 0,50$ ) e Filtração (Dunnett,  $q' = 4,35$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas na frequência cardíaca média (ANOVA,  $F = 17,71$ ;  $P < 0,001$ ) em relação ao teste base, as manipulações químicas com adição de EDTA e adição de Tiosulfato de sódio não apresentaram diferenças significativas.

A Aeração (Dunnett,  $q' = 7,52$ ;  $P < 0,50$ ) e Filtração (Dunnett,  $q' = 7,56$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 74,02$ ;  $P < 0,001$ ), mas apresentaram a média inferior de batimentos cardíacos em relação ao teste base. A adição de EDTA e adição de Tiosulfato de sódio apresentaram resultados superiores as médias do teste base e mais próximas ao resultado obtido com o grupo controle, demonstrando que neste parâmetro os tratamentos com adição de EDTA e adição de Tiosulfato de sódio são mais eficientes na redução de toxicidade no P3 no período chuvoso.

Gráfico 16 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 3 do período chuvoso comparados o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



O ponto de coleta 3, foi o que apresentou menor toxicidade no período seco em relação aos outros pontos de coleta, porém nos *endpoints* subletais, frequência cardíaca e teratogenicidade foi observada diferenças em relação ao controle. Na avaliação do AIT, no que diz respeito a coagulação dos ovos após 72h de manipulação, os quatro tratamentos apresentaram médias de coagulação maiores que a do teste base, os tratamentos com adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 4,33$ ;  $P < 0,50$ ) e Tiosulfato (Dunnett,  $q' = 7,66$ ;  $P < 0,50$ ) apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 11,65$ ;  $P = 0,092$ ), mostrando que nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de reduzir a toxicidade neste parâmetro (Gráfico 17).

Em relação a eclosão dos ovos após 96h de manipulação, o tratamento com adição de Tiosulfato de Sódio (Dunnett,  $q' = 4,67$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 9,07$ ;  $P = 0,217$ ) em relação ao teste base, mas tanto neste tratamento quanto os outros três não foram eficientes na redução da toxicidade, pois suas médias de eclosão de ovos, foram inferiores a apresentado pelo teste base.

Os resultados obtidos durante a análise da mortalidade total, continuam seguindo o padrão de resultados anteriores onde o tratamento com adição de Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 3,90$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferenças significativas (ANOVA,  $F = 1,65$ ;  $P = 0,219$ ) em relação ao teste base, se mostrando o tratamento com menor resposta positiva.

As quatro manipulações se mostraram eficazes na redução da teratogenicidade em relação ao teste base apresentando diferenças significativas (ANOVA,  $F = 55,15$ ;  $P < 0,001$ ), sendo o tratamento de Aeração (Dunnett,  $q' = 13,41$ ;  $P < 0,50$ ) mais eficiente, seguido pelo de adição de EDTA (Dunnett,  $q' = 12,97$ ;  $P < 0,50$ ), adição de Tiosulfato (Dunnett,  $q' = 12,52$ ;  $P < 0,50$ ) e Filtração (Dunnett,  $q' = 11,18$ ;  $P < 0,50$ ) (Figura 19).

Gráfico 17 – Média das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 3 do período seco comparadas com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)

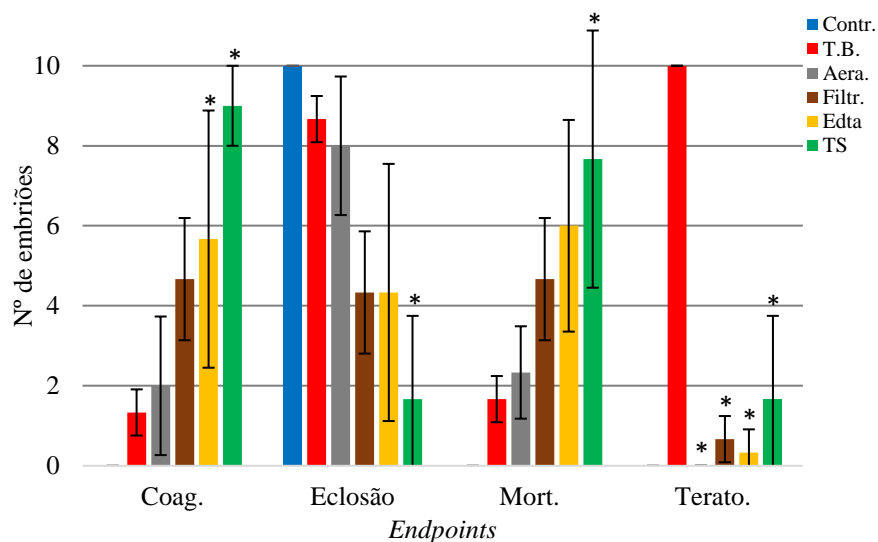


Figura 19 – Desenvolvimento dos embriões submetidos as manipulações dos elutriatos do P3/seco após 96h.



A: Teste de caracterização, B: Aeração, C: Filtração, D: Controle, E: Adição de EDTA, F: Adição de Tiosulfato de sódio

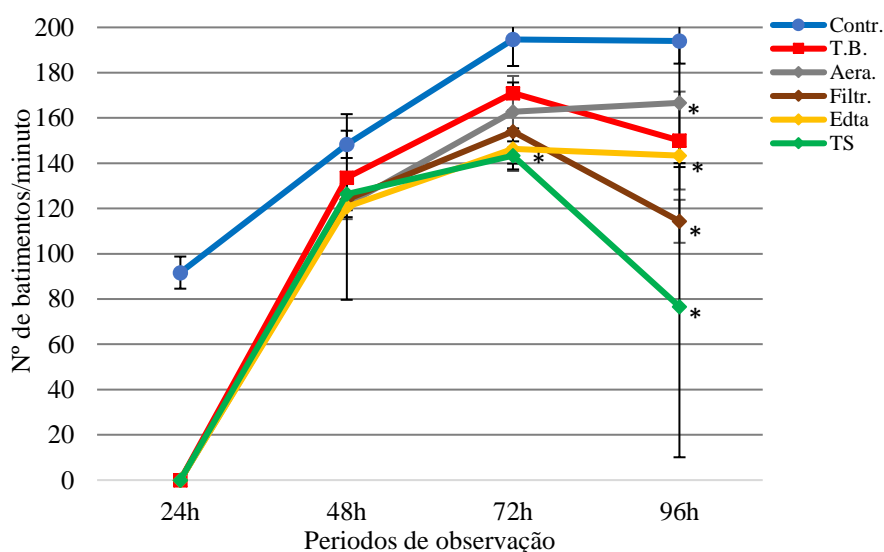
A frequência cardíaca apresentada pelas elutriatos manipulados no período seco em 24h não apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 500,83$ ;  $P = 1,00$ ) em relação ao teste base. As manipulações também não apresentaram diferenças significativas (ANOVA,  $F = 1,05$ ;  $P = 0,43$ ) em relação ao teste base em 48h de

exposição, porem nota-se um aumento da frequência cardíaca nas quatro, se aproximando do valor encontrado no teste base (Gráfico 18).

Em 72h de exposição o elutriato com o tratamento adição de Tiosulfato de sódio (Dunnett,  $q' = 3,01$ ;  $P < 0,50$ ) apresentou diferença significativa (ANOVA,  $F = 8,53$ ;  $P = 0,001$ ) em relação ao teste base, os com Aeração, Filtração e adição de EDTA, apresentaram frequências cardíacas médias de 162, 7; 154 e 146,3 respectivamente se aproximando do valor 171 batimentos/minuto encontrado durante o teste base.

Após 96h de exposição, as manipulações apresentaram diferenças significativas em relação ao teste base (ANOVA,  $F = 5,19$ ;  $P = 0,009$ ), variando os batimentos cardíacos de acordo com o tratamento, o que apresentou maior frequência cardíaca em relação ao teste base foi a Aeração (166,7 batimentos/minuto), as demais manipulações apresentaram frequências cardíacas inferiores que a do teste base.

Gráfico 18 – Média das frequências cardíacas diárias das manipulações ( $\pm$  desvio padrão) realizadas nos elutriatos do Ponto 3 do período seco comparados com o Teste base e o controle. (\* = diferenças significativas)



Tendo em vista os resultados obtidos pelas manipulações do AIT e sua heterogeneidade de toxicidade, tanto nos períodos quanto nos parâmetros avaliados, sugere-se que a contaminação dos pontos de coleta não é motivada apenas por um grupo de substâncias, mas possivelmente por dois ou três em cada ponto ou devido a interações físico-químicas, como será apontado na Tabela 8, mediante a redução da toxicidade dos elutriatos por mais de uma manipulação usada.

Tabela 8 - Indicação de possíveis contaminantes mediante a eficiência significativa das manipulações realizadas nos elutriatos do rio Capibaribe nos períodos chuvoso e seco.

Pontos de Coleta		P1					P2					P3														
Período		Chuvoso			Seco		Chuvoso			Seco		Chuvoso			Seco											
Endpoints		C	E	M	T	F	C	E	M	T	F	C	E	M	T	F	C	E	M	T	F	C	E	M	T	F
Manipulações	Possíveis contaminantes																									
<b>Aeração</b>	<b>Sólidos voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) ou flotáveis (surfactantes)</b>	X												X		X								X	X	
<b>Filtração</b>	<b>Sólidos filtráveis ou metais (atração pelo filtro de acetato de celulose)</b>	X		X					X	X				X		X	X				X					X
<b>Adição de EDTA</b>	<b>Metais catiônicos (Cr, Al, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Zn)</b>	X		X	X				X		X			X	X						X	X				X
<b>Adição de T. de Sódio</b>	<b>Oxidantes (cloro, peróxidos) e metais catiônicos (Cu, Cd e Hg)</b>					X			X					X	X						X					X

LEGENDA: C - coagulação 72h; E - eclosão 96h; M - mortalidade total 96h; T - teratogenicidade 96h; F - frequência cardíaca 96h.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 TESTE BASE E ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

Os resultados obtidos durante o Teste base comprovaram que as amostras coletadas nos três pontos do estuário do rio Capibaribe são tóxicas para os embriões de *Danio rerio*, corroborando àqueles apresentados em estudos anteriores realizados neste mesmo estuário, onde apontam que tanto a água, como sedimento e organismos presentes neste ambiente estão contaminados por diversas substâncias, como por exemplo: coliformes fecais, metais, organoestênicos, hidrocarbonetos, organoclorados, entre outros (FEITOSA, 1988; SILVA, 2004; CASTRO *et al.*, 2007; FARRAPEIRA *et al.*, 2010; MACIEL, 2015 (a;b); MACIEL, 2016; ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2016;).

A diferente toxicidade apresentada nos parâmetros avaliados entre pontos pode estar relacionada à distribuição granulométrica heterogênea e MO entre as amostras, como foi observado também nos estudos sobre o estuário do rio Capibaribe de Resende *et al.*, (2016) e Oliveira *et al.*, (2014), onde esses autores atribuem essa heterogeneidade à influência das fontes fluviais e marinhas. No presente estudo o Ponto 1 (Ponte da Caxangá) apresentou maior predominância da fração fina (silte + argila), seguido pelo Ponto 2 (Parque Santana), esse alto teor de lama no estuário do rio Capibaribe está provavelmente relacionado ao baixo fluxo de energia do estuário que pode favorecer a deposição dos sedimentos mais finos (Oliveira *et al.*, 2014), que de acordo com Fenili (2011) e Mudrock e Macknigh (1997) existe uma correlação entre as frações granulométricas finas e alguns contaminantes, como os metais, onde essas substâncias tendem a ficar adsorvidas em partículas menores, ficando incorporada principalmente na porção de silte e argila.

As análises granulométricas e MO observadas neste estudo corroboram com o trabalho de Resende *et al.*, (2016) que aprova a afirmação de que quanto maior o número de partículas finas no local maior o índice de matéria orgânica (GAO *et al.* 2012; SARMA *et al.*, 2012). Partículas menores de sedimento tendem a possuir sítios ativos que facilitam a adsorção da MO e compostos hidrofóbicos, como os HPA's (BÍCEGO *et al.*, 2008; XIA; WANG, 2008; ARAGHI *et al.*, 2014). Embasado em estudos pretéritos feitos em áreas costeiras impactadas, assim como o estuário do rio Capibaribe, pode-se esperar a tendência de haver contaminação por HPA's em sedimentos onde há predominância de

finos e, por consequência, um alto teor de MO (BÍCEGO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; WAGENER *et al.*, 2010; CHEN; CHEN, 2011; ARAGHI *et al.*, 2014).

O P1, ponto mais distante da desembocadura do rio, situado próximo a uma comunidade ribeirinha, que despeja todos seus dejetos sem nenhum tratamento diretamente no rio, apresentou maior complexidade de resultados no teste base do período chuvoso, segundo Coimbra (2015) os períodos chuvosos promovem uma maior lixiviação dos contaminantes que estejam adsorvidos no sedimento tornando-os biodisponíveis no ambiente, durante o período de chuvas o aumento das descargas de água podem potencializar o transporte dos contaminantes para corpos d'água.

No período seco houve a redução nos parâmetros que apresentaram-se tóxicos no chuvoso, sendo tóxico apenas no parâmetro dos efeitos teratogênicos, Bertolleti (2013) recomenda que sempre que os efeitos letais não forem suficientemente significantes para caracterizar um efeito tóxico, a utilização de ensaios de toxicidade crônica é indicada para observar os possíveis efeitos subletais apresentados pela amostra estudada, os resultados obtidos demonstram que os efeitos subletais são de suma importância para avaliação da toxicidade de amostras ambientais.

O P2, trouxe um efeito bem distinto entre os resultados do teste base dos períodos chuvoso e seco, expondo uma maior toxicidade durante o período seco, segundo Silva *et al.* (2006) a concentração de contaminantes, por exemplo os metais, durante o período seco fica mais concentrada na primavera e principalmente no verão tornando o ambiente mais tóxico.

Mediante aos parâmetros subletais avaliados (batimentos cardíacos e teratogenigidade) os pontos se mostram mais tóxicos quando avaliados por esses *endpoints*. Foi visto que dentre os efeitos teratogênicos observados o *delay* foi o mais presente nos embriões expostos aos elutriados, Tensolin *et al.* (2014) estudando os efeitos dos herbicidas em embriões de *D. rerio* também observou dentre os *endpoints* utilizados que o atraso do desenvolvimento (*delay*) foi o caso mais encontrado na contaminação por esses compostos.

Também foi observado nos 3 pontos uma redução na taxa de ovos eclodidos, segundo Dammisk *et al.* (2011), geralmente os ovos de *D. rerio* levam de 2 a 3 dias após fertilização, este tempo varia também de acordo com a temperatura, mais como os bioensaios foram realizados *in situ* com temperatura padronizada de 25° C, este efeito

pode ter sido causado por outros fatores como os possíveis contaminantes presentes no elutriatos. Edemas de pericárdio, edema de saco vitelino, escoliose foram observados em alguns embriões exposto com as amostras do presente estudo, essas más formações também descritas em trabalhos que estudaram a toxicidade de fármacos e metais pesados (WHATSON *et al.*, 2014; TENSOLIN, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; TOKUNAGA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Na avaliação da frequência cardíaca diária dos embriões, foi visto que estes animais expostos apresentaram um decrescimento de batimentos, principalmente nas primeiras 48h de exposição, corroborando com o *delay* do desenvolvimento igualmente observado nas amostras analisadas, Andrade (2004), Naguel (2002), Samson *et al.*, (2001) também notaram um decrescimento nos batimentos cardíacos dos embriões de *D. rerio*, quando expostos a um efluente têxtil, ao propanol e a Metil mercúrio. Andrade (2004) e Billiard *et al.*, (1999) reconheceram que os batimentos cardíacos revelou ser um parâmetro que reage precocemente a toxicidade de efluente têxtil e as manifestações cardiovasculares como primeiro alvo do peixe zebra quando exposto a dioxinas

Alguns estudos já reportaram alterações a níveis ecológicos em comunidade bióticas do estuário do rio Capibaribe, tais evidencias demostram o risco de grandes proporções para os táxons oligocheata e nematoda (VALENÇA, 2009), outros estudos utilizando espécies de cladoceros, bivalves, poliquetas e crustáceos (PARANGUÁ *et al.*, 2005; MACIEL, 2015) registraram alterações biológicas e fisiológicas nesses organismos e nas comunidades resultantes da exposição ao poluentes, nenhum estudo ainda foi feito para avaliar os efeitos dos peixes expostos as contaminantes presentes no estuário em questão.

## 6.2 AIT

### 6.2.1 Ponto 1

Após a aplicação das manipulações propostas pelo AIT e os resultados obtidos por estas, mostrou que o processo de Filtração foi uma das manipulações que reduziu a toxicidade dos parâmetros avaliados nos embriões expostos aos elutriatos do Ponto 1, acordo Welkje (2010) a membrana de acetato de celulose usada no tratamento de filtração além de reter as partículas mais finas do sedimento que ficaram suspensas no elutriato,



apresentam uma grande afinidade pelos metais, devido a existência de uma atração eletrostática entre a membrana e os metais, o que sugere uma possível contaminação por substâncias do grupo dos metais neste ponto.

Hockett e Mount (1996) conduziram estudos de AIT em um efluente de uma pequena indústria e notaram que a adição de EDTA e tiosulfato de sódio eliminou a toxicidade aguda do efluente para o organismo *Ceriodaphia dubia*, aliado a outros fatores como redução de toxicidade após filtração, os autores suspeitaram que os responsáveis pela toxicidade eram metais, como é o caso da amostra P1 do presente estudo.

A aeração foi uma das manipulações que reduziu a toxicidade de maneira significativa, e que pode ser uma indicação que houve volatilização de algum composto orgânico inclusive surfactante (devido à redução simultânea pela filtração). Segundo Lavorante (2014) quanto maior for o número de manipulações que reduzam a toxicidade da amostra, maior será a complexidade toxicológica do local, devido as diversas fontes de contaminações nota-se que a amostra em estudo sugere que a presença de mais de 4 classes de contaminantes associados à toxicidade do local.

### **6.2.2 Ponto 2**

O ponto P2 também apresentou na análise granulométrica um grande percentual de finos, é possível que mediante a isto, a manipulação com filtração tenha mostrado maior redução de toxicidade, seguida pelas adições de EDTA e Tiosulfato de sódio o que sugere que o composto que é responsável pela toxicidade do local também faz parte do grupo dos metais. Lyman (1995) afirma que os metais podem ser adsorvidos pelo material em suspensão, podendo formar complexos com outras inúmeras substâncias orgânicas naturais ou sintéticas, onde estas ligações podem ser influenciadas principalmente pela temperatura, pH e o tipo de ligante.

As manipulações variaram na redução da toxicidade do ponto P2 que se mostrou muito mais complexo durante o período seco, a manipulação com adição de EDTA potencializou o efeito tóxico da amostra, causando 100% da coagulação dos ovos, estudos préteritos insinuam que quando há o aumento da toxicidade após esta manipulação, pode estar associado ao fato deste quelante ter retirado algum metal que estava inibindo a toxicidade, e sua ausência aumenta o efeito letal (RAJENDA KANAL *et al.*, 2015; JIN-

SUNG *et al.*, 2016) o EDTA também não é eficaz na remoção de complexos com metais aniônicos e forma ligações fracas com Ag, Cr e Tl (USEPA, 1996).

### 6.2.3 Ponto 3

As manipulações variaram a eficiência no P3, porém de modo geral as mais eficazes foram respectivamente a adição de EDTA e a filtração o que sugere uma contaminação por metais, a manipulação com aeração teve uma alta taxa de eclosão, mas a maioria das larvas eclodidas apresentaram efeitos teratogênicos, segundo Cavalcanti (2017) as larvas recém eclodidas por estarem fora do ovo não possuem nenhuma barreira ou estrutura que impeça ou diminua a exposição de certos contaminantes, o que indica que a aeração não foi capaz de retirar todos contaminantes presentes na amostra, o que sugere que na amostra possui mais de um grupo tóxico, porém os que são removidos pela aeração, como os compostos oxidáveis, voláteis e subláteis não foram os responsáveis efeito teratogênico nas larvas.

A manipulação com Tiosulfato de sódio não foi eficaz neste ponto, pois aumentou o número de ovos coagulados e os causou a eclosão prematura nos ovos que chegaram a se desenvolver. Sabe-se que sinais físicos e químicos detectados pelo embrião ativam a produção da enzima relacionada a eclosão (corionase), que degrada a camada interna do córion e permite movimentos que proporcionam o evento da eclosão (FUIMAN, 2002).

Diferentes mecanismos tóxicos podem justificar o atraso ou falha na eclosão, como a indução funcional anormal da enzima corionase e/ou a incapacidade das larvas emergentes de quebrar a casca dos ovos (HALLARE *et al.*, 2005; JEZIERKA *et al.*, 2009). Corroborando com o estudo de Jesierska *et al.* (2009) que afirma que os metais podem inibir ou acelerar o processo de eclosão dos peixes, a eclosão prematura, também foi observada nos estudos de Jesus *et al.* (2013) e de Oliveira *et al.* (2013), onde houve aumento na taxa de eclosão de *D. rerio* expostos ao antisséptico clorexidina e ao antibiótico amoxicilina, o presente estudo sugere que o tratamento com Tiosulfato retirou o/os composto (s) que mantinham a toxicidade menor desta amostra.

A aeração pode proporcionar remoção dos efeitos tóxicos por volatilização, remoção de surfactantes por emulsão e alteração química da substância tóxica por oxidação. Algumas substâncias com estas características seriam o sulfeto de hidrogênio,

a amônia e os hidrocarbonetos voláteis (U.S.EPA, 1991; 1996). Perdas consideráveis de amônia em meio aquoso ocorrem por volatilização e/ou aumento de pH (WHO, 1992). Foi a aeração a manipulação que reduziu de forma mais eficiente os efeitos tóxicos do ponto P3, sugerindo que compostos susceptíveis a estes processos podem estar envolvidos com a toxicidade inicialmente verificada.

Ankley *et al.*, (1990) abordaram as características de surfactantes durante o processo de AIT e foi verificado que a toxicidade dos surfactantes pode ser removida pela aeração, provavelmente pelo o processo de sublação e pela filtração das amostras, o que sugere que este ponto de coleta no estuário do rio Capibaribe esteja sofrendo o efeito toxico deste grupo de contaminante pelo fato das manipulações de aeração e filtração terem sido as mais eficientes na redução da toxicidade.

Na região mais próxima a desembocadura do estuário, elevados níveis de imposex (formação de órgãos masculinos em fêmeas de gastrópode) foram reportados por Castro *et al.*, (2007), este fenômeno pode ser resultado da exposição dos organismos a compostos orgânicos como tribulestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT), concentrações de metais também foram encontrados nos sedimentos do estuário do rio Capibaribe, teores de cádmio, cobre, ferro, cromo, zinco e manganês apresentaram concentrações muito acima do permitido, sendo a fauna região mais próxima da foz a mais impactada.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação ambiental na atualidade tem uma importância considerável, visto que devido as atividades humanas, a pressão sobre os recursos naturais apenas aumentou. Observa-se que hoje existem milhares de substâncias químicas que são lançadas no ambiente pontualmente ou difusamente, resíduos das atividades humanas.

Devido a essa complexidade, as técnicas da avaliação desses ecossistemas, deve integrar ferramentas que reduzam as incertezas e estabeleçam medidas de controle e recuperação. Mediante a isto o AIT assume no mundo atual um importante papel nos estudos de ambientes degradados por substâncias químicas e resíduos gerados por atividades antrópicas.

Diante destes resultados, conclui-se que a toxicidade das amostras coletadas no estuário do rio Capibaribe é variável e bastante complexa, fato que pode ser atribuído à diversidade de atividades realizadas na área, às diferentes influências sofridas pelos pontos estudados. A toxicidade das amostras de sedimento aos embriões de *Danio rerio* pode ser atribuída a substâncias de diferentes fontes e às várias relações e efeitos que estas podem apresentar quando presentes simultaneamente no ambiente.

Trata-se do primeiro trabalho de AIT realizado na região estuarina do rio Capibaribe, cujos estudos necessitam ser aprofundados com a utilização de outras técnicas analíticas e de preparo de amostra para fornecer mais informações em relação as possíveis causas da toxicidade da região, como por exemplo as Fase II e III do AIT. Assim com trabalhos que façam uma correlação entre os grupos contaminantes encontrados nos pontos e as fontes poluidoras circundantes. Notou-se que a adição de parâmetros subletais, com teratogenicidade e frequência cardíaca, contribuiu para aumento da sensibilidade do teste, demonstrando de forma prévia os efeitos causados pelas amostras ambientais.

A resolução de qualquer problema relacionado a toxicidade do estuário do Rio Capibaribe, assim como já exposto em estudos anteriores, está na adoção de políticas públicas para solução de problemas de saneamento básico, conscientização da população, incentivo aos meios de produção mais sustentáveis, investigação de indústrias com descargas irregulares e por fim, projetos de monitoramento ambiental mais frequentes e com maior duração, que poderão subsidiar quaisquer ações de manejo de forma mais adequada.

## 8 REFERENCIAS BIBLIGRAFICAS

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade dos sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil.** 2002. Tese – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ABESSA, D. M. S.; MORAIS, L. G.; PERINA, F. C.; DAVANSO, M. B.; BURUAEM, L. M.; MARTINS, L. M. P.; RODRIGUES, V. G. S. Toxicidade de águas e sedimentos em um rio afetado por atividades mineradoras pretéritas. *Revista O Mundo da Saúde*, v. 36, p. 610-618, 2012.

ABESSA, D. M. S.; SOUZA, E. C. P. M.; TOMMASI, L. R. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia. Fortaleza*, v. 19, p. 269-277, 2006.

ABESSA, D. M. S.; SOUZA, E. C. P. M. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* to  $K_2Cr_2O_7$ . *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 46, n. 1, p. 53-55, 2003.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. In: Hoffman, D. J.; Rattner B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088:** Ecotoxicologia aquática, Toxicidade aguda, Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499:** Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica de curta duração, Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2007.

AKANDE, M. G.; ORG, S.; NORRGREN, L. Evaluation of the toxic effects of clozapine in zebrafish (*Danio rerio*) embryos with the fish embryo toxicity test. *International Journal on pharmaceutical and biomedical research.*, v. 1, p. 90-94, 2010.

ANKLEY, G. T.; BURKHARD, L. P. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11, p. 1235-1248, 1992.

ANKLEY, G. T.; PETERSON, G. S.; LUKASEWYCZ, M. T.; JENSEN, D. A. Characteristics of Surfactants in Toxicity Identification Evaluations. *Chemosphere*, v. 21, n. 1-2, p. 3-12, 1990.

ANDERSON, B.; HUNT, J.; PHILLIPS, B.; THOMPSON, B.; LOWE, S.; TABERSKI, K.; CARR, R.S. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environmental Research*, v.105, p.145-155, 2007.

ANDERSON, B. S. M; PHILLIPS, B. M.; HUNT, J. W.; CLARK, S. L.; VOORHEES, J. P.; TJEERDEMA, R. S.; CASTELINE, J.; MEKEBRI, A. Evaluation of methods to determine causes of sediment toxicity in San Diego Bay, California, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 4, p. 534–540, 2010.

ANDRADE, R. M. S. L. **Efeitos da Exposição de peixe zebra, *Danio rerio*, a um efluente têxtil.** Dissertação, Universidade do Porto, 2004.

APHA – American Public Health Association. Standard Methods for Examination of Water and wastewater. New York, 2005.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 117-152p, 2006.

ARAGHI, P. E., BASTAMI, K. D., RAHMANPOOR, S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments of Gorgan Bay, Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 89, p 494–498, 2014.

ARAÚJO, C. F. C.; SOUZA-SANTOS, L. P. Use of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to assess water toxicity in the Suape industrial-port complex of Pernambuco, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 89, n. 1, p. 212–221, 2013.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. **O copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos**. (Tese) Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2008.

ARAÚJO, R.P.A.; BOTTA, C. M. R.; SILVÉRIO, P. F.; ALMEIDA, F. V.; RODRIGUES, P. F.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F.; MOZETO, A. A. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 2, p. 581–588, 2006.

ARENZON, A; DE LORENZO, C; COIMBRA, N. J; SCHULZ, U. H. A determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? *Ecotoxicology Environmental Contamination*, v. 8, n. 2, p. 65-68, 2013.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, p. 263-298, 2003.

BADARÓ-PEDROSO, C.; RACHID, B. R. F. **TIE - Técnicas para identificação de agentes tóxicos em amostras líquidas**. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M. e NIPPER, M. (Org.). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002. p. 217–262.

BAILEY, C. H.; MILLER, J. L.; MILLER, J. M. Application of toxicity identification procedures to the echinoderm fertilization assay to identify toxicity in a municipal effluent. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 14, n. 12, p. 2181–2186, 1995.

BARBAZUK, W.B., KORF, I., KADAVI, C., HEYEN, J., TATE, S., WUN, E., BEDELL, J. A., MCPHERSON, J.D., JOHNSON, S.L., The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*. v. 10, p.1351-1358, 2000.

BARBOSA, D. S. **Avaliação e Identificação de Toxicidade da água e sedimento de nascentes do Rio Mogi. São Carlos - SP**. Dissertação, Universidade de São Carlos, 2010.

BARROS, C. N.; VAZ, R. V.; PINTO, S. L.; SOUZA, M.; MENDES, E. S. **Coliformes na água e no molusco bivalve *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN,1791) da Baía do Pina, Recife, Pe**. Jornada de ensino, pesquisa e extensão, Anais, Recife. 2009.

BERTOLETTI, E. Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil. *Jornal Brasileiro Sociedade. Ecotoxicologia*. v. 4, n. 1-3, 2009.

BÍCEGO, M. C., SEYFFET, B. H., MARTINS, C. C., FILMANN, G. **Poluição por Petróleo**. In: J. A. Baptista Neto; M. Wallner-Kersanach; S. M. Patchineelam (Eds.). *Poluição Marinha*. Editora Interciência. p.77–96, 2008.

BÍCEGO, M. C., TANIGUCHI, S., YOGUI, G. T., MONTONE, R. C., SILVA, D. A. M., LOURENÇO, R. A., MARTINS, C. C., SASAKI, S. T., PELLIZARI, V. H., WEBER, R. R. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, p. 1804–1816, 2006.

BILLIARD, S. M., QUERBACH, K. & HUDSON, P. V., 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18.(9): 2070-2077.

BOHRER, M. B. C. Aplicação do TIE ao efluente de um pólo petroquímica utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richarr, 1894 (Cladocera, Crustacea). Relatório Técnico (dados não publicados), 1993.

BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; ROCHA, O. Proposta de utilização de solubilizado como fase líquida nos estudos de “AIT” de sedimentos contaminados. In: VI ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA E III REUNIÃO DA SETAC LATINO-AMERICANA, 2000, São Carlos. 2000, p. 57.

BOTTA-PASCHOAL, C. M. R. Avaliação ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da bacia do rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação do estudo de AIT - Avaliação e Identificação da Toxicidade. São Carlos-SP. Apresentada como tese de doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo, 2002.

BRAYNER, F.M.M.; MATVIENKO, B. Manganese and iron as oxygen carriers to anoxie estuarine sediment. *Journal de Physique*, v. 107(1), p. 22-232, 2003.

BRAUNBECK, T.; LAMMER, E. **Fish Embryo Toxicity Assays**. German Federal Environment Agency. UBA, 2006.

BURGESS, R.M.; HO, K.T.; TAGLIABUE, M.D.; KUHN, A.; COMELEO, R.; COMELEO, P.; MODICA, G.; MORRISON, G.E. Toxicity characterization of an industrial and a municipal effluent discharging to the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v.30, n.8, p.524-535, 1995.

CABRAL, C. B. **Variabilidade Longitudinal e Mareal das concentrações de Hidrocarbonetos de Petróleo no Estuário do Rio Capibaribe**. Recife. Monografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

CALOW, P. Ecology in ecotoxicology: Some possible ‘rules of thumb’. In: BAIRD, D. J.; MALTBY, L.; GREIG-SMITH, P. W.; DOUBEN, P. E. T. *Ecotoxicology: Ecological Dimensions*. Chapman and Hall, London, v. 1, n.1, p. 5–12, 1996.

CARIELLO, M.S. Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e nos microcrustáceos marinhos *Nitokra* sp e *Leptocheirus plumulosus*, 2012.

CARR, R.S.; BIEDENBACH, J.M.; HOOTEN, R.L. Sediment quality assessment survey and toxicity identification evaluation studies in Lavaca Bay, Texas, a marine superfund site. *Environmental Toxicology*, v.16, p.20-30, 2001.

- CASTRO, I. B. et al. Imposex in two muricid species (Mollusca:Gastropoda) from the northeastern Brazilian Coast. *Journal. Brazilian Society Ecotoxicology*, v.2 n.1 p. 81-91. 2007.
- CHAPMAN, P. M. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, n. 7, p. 589-599, 1989.
- CHAPMAN, P. M. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science of The Total Environment*, v. 97–98, n. 0, p. 815-825, 1990.
- CHAPMAN, P. M. Ecotoxicology and Pollution: Key Issues. *Marine Pollute Bulletin*. v. 31, n. 4-12, p. 167-177, 1995.
- CHAPMAN, P.M.; MANN, G.S. Sediment Quality Values (SQVs) and Ecological Risk Assessment (ERA). *Marine Pollute Bulletin*, v. 38(5), p. 339-344, 1999.
- CHAPMAN, P.M.; WANG, F.; GERMANO, J.D.; BATLEY, G. Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Marine Pollution Bulletin*. V. 44, P. 359–366, 2002.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO-CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB; Brasília: ANA, 2011.
- CHEN, C.W.; CHEN, C. F. Distribution, origin, and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, v. 63 (5-12), p. 417–423, 2011.
- COIMBRA, C. D.; CARVALHO, G.; PHILIPPINI, H.; SILVA, M. F. M.; NEIVA, E. Determinação da concentração de metais traço em sedimentos do estuário do rio Maracáipe – Pe/Brasil. *Brazilian Journal Aquatic Science Technology*. v. 19(2), p. 58 – 75, 2015.
- CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente / Ministério do Meio Ambiente), 2012. Resolução N° 454, de 01 de novembro de 2012. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693>. Acesso em: novembro, 2017.
- COOK, L. W., PARADISE, C. J., LOM, B. The pesticide malathion reduces survival and growth in development zebrafish. *Environmental Toxicology Chemistry*. v. 24, p. 1745–1750, 2005.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p.1820–1830, 2008.
- CPRH, 2008. **Monitoramento das Bacias - Capibaribe**. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br>. Acesso em: novembro, 2017.
- CPRH, 2007. **Lei N° 13.361**, de 13 de dezembro de 2007. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/lei-13361.pdf> acesso novembro 2017.



DAFLON, S. D. A., **Avaliação e identificação de toxicidade (AIT) em efluente de uma refinaria de petróleo visando à remoção de toxicidade crônica**. Tese, Universidade federal do Rio de Janeiro, 2015

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish. Manual de criação de biotério**. Universidade Federal do Paraná, 1ª ed., 106 p., Curitiba, 2011.

DELVALLS, T.A., ANDRES, A., BELZUNCE, M.J., BUCETA, J.L., CASADO-MARTÍNEZ, M.C., CASTRO, R., RIBA, I., VIGURI, J.R., BLASCO, J., Chemical and ecotoxicological guidelines used for managing disposal of dredged material. *Trends Anal. Chem.* v. 23 (10–11), p. 819–828, 2004.

DIN. **German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Subanimal testing (group T)** Part 6: Toxicity to fish. Determination of the Non-acute- oisonous Effect of Waste Water to Fish Eggs by Dilution Limits (T 6). DIN 38415-6. German Standardization Organization. 2001.

DORN, B.; RODGERS, J. H. Variability associated with identification of toxics in national pollutant discharge elimination system (NPDES) effluent toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, n. 10, p. 893–902, 1989.

EFSA - European Food Safety Administration. **Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes**. EFSA J 292, 1–46. 2005.

ELLIOTT, M.; MCLUSKY, D. S. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuarine Coastal Shelf Science*, v. 55, p. 815–827, 2002.

FANG, Y. X.; YING, G. G.; ZHANG, L. J.; ZHAO, J.; SU, H. YANG, B.; LIU, S. Use of TIE techniques to characterize industrial effluents in the Pearl River Delta region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 76, n. 2, p. 143–52, 2012.

FARRAPEIRA, C.M.R. Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal Biology* v. 70, n. 2, p. 301-309, 2010.

FAVROD, N. Determinação de hidrocarbonetos do petróleo dissolvidos e/ou dispersos nas águas do complexo estuarino da Baía do Pina – Baía Portuária (Porto de Recife), 2012.

FEITOSA, F.A.N. **Produção primária do Fitoplâncton correlacionada com parâmetros bióticos e abióticos na baía do Pina (Recife, Pernambuco, Brasil)**. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco. 1988.

FENILI, L. H.; GOMES, C. C.; ROCHA, V. F.; ZANIN, G. R. **Avaliação da concentração de metais e arsênio e sua relação com granulometria e ensaios ecotoxicológicos no canal do porto de Santos**. V Simpósio Brasileiro de Oceanografia, Santos, SP, 2011.

FERRAZ, M. A. **Desenvolvimento e aplicação de um método para a avaliação e identificação da toxidade usando o organismo bentônico *Nitocra* sp (Crustacea: Copepoda: Harpacticoida)**. Dissertação, Universidade Santa Cecília, 2013.

FERNANDES, M.B. et al. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. *The Science of the Total Environment*, v.231, p. 1-16, 1999.

FITZGERALD, D. M.; KNIGHT, J. **High Resolution Morphodynamics and Sedimentary Evolution of Estuaries**. New York, 2005.

FUIMAN, L.A. **Special considerations of fish eggs and larval**. In: FUIMAN, L.A.; WERNER, R.G. (eds). *Fishery Science: The unique contributions of early life stage*. Blacwell Science, p.1-32, 2002.

FURLEY, T. H. **Identificação da causa da toxicidade de efluentes de fábricas de celulose e papel da América Latina**. *O Papel*, p. 34-42, 2009.

GAO, X.; YANG, Y.; WANG, C. Geochemistry of organic carbon and nitrogen in surface sediments of coastal Bohai Bay inferred from their ratios and stable isotopic signatures. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 6, p. 1148–1155, 2012.

GOLDING, C.; KRASSOI, R.; BAKER, E. The development and application of a marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) protocol for use with an australian bivalve. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, v. 12, p. 37–44, 2006.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. Série Manuais, SMA – CETESB. v. 1, n. 1, p. 17, 1990.

GRINEVICIUS, V. M. A. S. Avaliação da Remediação de Efluentes de uma Indústria Têxtil Utilizando Bioindicadores e Biomarcadores. Apresentada como dissertação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. 179 p.

GROSELL, M.; WOOD, C. M., Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal Experience Biology*. v. 205, p. 1179-1188, 2002.

GUSSO-CHOUERI, P. K., CHOUERI, R. B., SANTOS, G. S., ARAUJO, G. S., CRUZ, A. C. F., STREML, T., CAMPOS, S. X., CESTARI, M. M., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., ABESSA, D. M. S. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, v. 104, p. 229-239, 2016.

HALLARE, A.V.; SCHIRLING, M.; LUCKENBACH, T.; KOHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*., v. 30, p. 7-17, 2005.

HEINIS, L. J.; HIGHLAND, T.; MOUNT, D. R. Method for Testing the Aquatic Toxicity of Sediment Extracts for Use in Identifying Organic Toxicants in Sediments. *Environmental Science & Technology*, v. 38, p. 6256–6262, 2004.

HO, K.T., BURGESS, R.M., **Marine Sediment Toxicity Identification Evaluations (TIEs): History, Principles, Methods, and Future Research**, vol. 5, p. 75– 95, 2009.

HOCKETT, J. R.; MOUNT, D. R. Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 15, n. 10, p. 1687–1693, 1996.

HOLLERT, H., KEITER, S., KONIG, N., RUDOLF, M., ULRICH, M., BRAUNBECK, T. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal Soils Sediment*. v. 3, p. 197–207, 2003.

- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- HOGAN, A. C.; STAUBER, J. L.; PABLO, F.; ADAMS, M. S.; LIM, R. P. The development of marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures using the unicellular alga *Nitzschia closterium*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 433–43, 2005.
- HONGXIA, Y.; JING, C.; YUXIA, C.; HUIHUA, S.; ZHONGHAI, D.; HONGJUN, J. Application of toxicity identification evaluation procedures on wastewaters and sludge from a municipal sewage treatment works with industrial inputs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 57, p. 426–430, 2004.
- JESUS, F.T.; OLIVEIRA, R.; SILVA, A.; CATARINO, A.L.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A.; DOMINGUES, I. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*. v. 22, p. 1348-1358, 2013.
- JEZIEWSKA, B.; LUGOWSKA, K.; WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology Biochemistry*. v. 35, p. 625-640, 2009.
- JIN, H.; YANG, X.; YIN, D.; HONGXIA, Y. A Case Study on Identifying the Toxicant in Effluent Discharged from a Chemical Plant. *Marine Pollution Bulletin*, v. 39, n. 1, p. 122–125, 1999.
- JING, S.; RONG, Z.; JING, S.; LU, G.; XIN, Z.; CUIXIA, D., YANG, L.; AIOHONG, M., ZHAO, Q.; YUPEI, W., HONG, Z. Toxic effects of <sup>56</sup>Fe ion radiation on the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *Aquatic Toxicology*. v. 186. p. 87-95. 2017
- JONAS, A. et al. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays. *Chemosphere*, v. 120, p. 321–327, fev. 2015.
- KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of *zebrafish* behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.
- KANG, S.-W.; SEO, J.; HAN, J.; LEE, J.-S.; JUNG, J. A comparative study of toxicity identification using *Daphnia magna* and *Tigriopus japonicus*: implications of establishing effluent discharge limits in Korea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 63, n. 5–12, p. 370–5, 2011.
- KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; MCMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, W. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons**, New York, v. 6, n.1, cap. 29, 2001.
- KIM, N. S.; SHIM, W. J.; YIM, U. H.; et al. Three decades of TBT contamination in sediments around a large scale shipyard. *Journal of Hazardous Materials*, v. 192, n. 2, p. 634–642, 2011
- KNIE, J. L.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis. Ed. FATMA / GTZ, 2004.

KWOK, Y. C.; HSIEH, D. P. H.; WONG, P. K. Toxicity identification evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 51, p. 1085–1091, 2005.

LAALE, H. W. The biology and use of zebrafish, *Danio rerio* in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biology*. v. 10, p. 121-173, 1977.

LAMMER, E., CARR, G.J., WENDLER, K., RAWLINGS, J.M., BELANGER, S.E., BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v. 149, p. 196–209, 2009.

LAVORANTE, B. R. B. O.; OLIVEIRA, D. D.; COSTA, B.V.M.; SOUZA-SANTOS, L. P. A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 95, p. 52–59, 2013.

LAVORANTE, B. R. O. **Aprimoramento de método com náuplios de *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida) e sua utilização no estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade das águas do complexo estuarino de Suape.** Tese, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.*; v. 8(5), p. 353-67, 2007.

LI, K.; WU, J.; JIANG, L.; SHEN, LI.; LI, J.; HE, Z.; WEI, P.; LV, Z.; HE, M. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere.*, v. 171, p. 40-48, 2017.

LINKOV, I.; VON STACKELBERG, K.E.J.; BURMISTROV, D.; BRIDGES, T.S. Uncertainty and variability in risk from trophic transfer of contaminants in dredged sediments. *The Science of the Total Environment*. v. 274, p. 255-269, 2001.

LYMAN, W.J. **Transport and transformation processes.** In: RAND, G.M. *Fundamentals of Aquatic Ecotoxicology*, Florida: Taylor & Francis, cap. 15, p. 449–492, 1995.

MACIEL, D. C. **Avaliação da contaminação do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe através da tríade da qualidade do sedimento.** Tese (Doutorado), Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 210 p., 2015.

MACIEL, D. C.; SOUZA, J. R. B.; TANIGUCHI, S.; BICEGO, M. C.; ZANARDI-LAMARDO, E. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 101, p. 429-433, 2015a.

MACIEL, D. C.; COSTA, B. V. M.; SANTOS, L. P. S.; SOUZA, J. R. B.; ZANARDI-LAMARDO, E. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copepodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkmann Rocco (1973). *Tropical Oceanography (Online)*, v. 43, p. 26-37, 2015b.

MACIEL, D. C.; SOUZA, J. R. B.; TANIGUCHI, S.; BICEGO, M. C.; SCHETYINI, C. A. F., ZANARDI-LAMARDO, E. Hydrocarbons in sediments along a tropical estuary shelf transition area: Sources and spatial distribution. *Marine Pollution Bulletin*, 2016.

- MACKEN, A.; GILTRAP, M.; FOLEY, B.; et al. A model compound study: the ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environmental Pollution*, v. 153, n. 3, p. 627–37, 2008.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemical Physiology*, v. 133, p. 151-160, 2002.
- MARTINS, C. C.; MAHIQUES, M. M.; BÍCEGO, M. C.; FUKUMOTO, M. M.; MONTONE, R. C. Comparison between anthropogenic hydrocarbons and magnetic susceptibility in sediment cores from the Santos Estuary, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, n. 2, p. 240-246, 2007.
- MATOS, M. F. **Avaliação e identificação da toxicidade de amostras de água e sedimento do Reservatório de Funil, RJ. Itajubá-MG.** Dissertação, Universidade Federal de Itajubá, 2011.
- MEHLER, W. T.; YOU, J.; MAUL, J. D.; LYDY, M. J. Comparative analysis of whole sediment and porewater toxicity identification evaluation techniques for ammonia and non-polar organic contaminants. *Chemosphere*, v. 78, n. 7, p. 814–21, 2010.
- MELO, E. D. DE; MOUNTEER, A. H.; LEÃO, L. H. D. S.; BAHIA, R. C. B.; CAMPOS, I. M. F. Toxicity identification evaluation of cosmetics industry wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 244-245, p. 329–334, 2013.
- MIRANDA, L. B., CASTRO, B. M., KJERFVE, B. **Princípio de Oceanografia Física de Estuários.** Editora da Universidade de São Paulo, 2002
- MOALLA, S. M. N.; AWADALLAH, R. M.; RASHED, M. N. Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. *Hydrobiologia*, v.364, p.31-40, 1998.
- MONTEIRO, L. H. U., SILVA, G. S., COUTINHO, P. N. **Estudos hidrodinâmicos e hidroquímicos do estuário do rio Capibaribe e Bacia do Pina, Recife-PE.** V Simpósio Brasileiro de Oceanografia. Santos, São Paulo, Brasil. 2011.
- MONTERO, N.; BELZUNCE-SEGARRA, M. J.; GONZALEZ, J. L.; et al. Application of Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures for the characterization and management of dredged harbor sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 71, n. 1–2, p. 259–268, 2013.
- MUDROCH, A.; MACKNIGHT, S.D. **Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling.** CRC Press, 1997.
- MUÑOZ, M. J.; TARAZONA, J. V. Synergistic effect of two-and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: phenanthrene, anthracene, naphthalene and acenaphthene on *Daphnia magna*. New York, Bull. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 50, p. 363 - 368, 1993.
- NAGEL, R. Darl: The EmbryoTest with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex 19*, v. 1, p. 38-48, 2002.

NILIN, J. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SEDIMENTO DO ESTUÁRIO DO RIO CEARÁ. 2008. Tese (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

NIPPER, M.G.; GREENSTEIN, D.J.; BAY, S.M. Short- and Long-term sediment toxicity test methods with the amphipod *Grandidierella japonica*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.8, p.1191- 1200, 1989.

NIPPER, M.G. **The development and Application of Sediment Toxicity Tests for Regulatory Purposes**. In: Wells, P.G.; K. Lee & C. Blaise. *Microscale testing in aquatic toxicology advances, techniques and practice*. Florida. 1997.

NÓBREGA, A. S. C. **Fontes de Contaminação No Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD Guideline, 236, 22 p., 2013.

OLIVEIRA, D. D., SOUZA-SANTOS, L. P., SILVA, H. K. P., MACEDO, S. J. Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 104, p. 373-378, 2014.

OLIVEIRA, J. M. M.; GALHANO, V.; HENRIQUES, I.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Basagran induces developmental malformations and changes the bacterial community of zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, v. 221, p. 52-63, 2017.

OLIVEIRA, T. S.; BARCELLOS, R.O. L.; SCHETTINI, C. S. A. F.; CAMARGO, P. B. Processo sedimentar atual e distribuição da matéria orgânica e um complexo estuarino tropical, Recife, PE, Brasil. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, v. 14, p. 399-411, 2014.

PARANAGUÁ, M. N. Cladocerans (Branchiopoda) of a Tropical Estuary in Brazil. *Brazilian Journal Biology*. v. 65 n.1 p. 107-115. 2005.

PASCHOAL, C.M.R.B. **Avaliação Ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da bacia do rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação do estudo de AIT – Avaliação e identificação da toxicidade**. Tese, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2002.

PERILLO, G. M. E. *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Elsevier, p. 17-46, 1996.

PERRON, M. M.; BURGESS, R. M.; KAY, T. H. O.; PELLETIER, M. C.; CANTWELL, M. G.; SHINE, J. P. Bioavailability assessment of a contaminated field sediment from Patrick Bayou, Texas, USA: Toxicity identification evaluation and equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, n. 3, p.742–750, 2010.

PHILLIPS, B. M.; ANDERSON, B. S.; HUNT, J. W. Evaluation of phase II toxicity identification evaluation methods for freshwater whole sediment and interstitial water. *Chemosphere*, v. 74, n. 5, p. 648–53, 2009.

PICONE, M.; BERGAMIN, M.; VOLPATO E.; DELANEY E.; TURETTA, C.; RANALDO, M.; CAPODAGLIO, G.; NASCI, C. Sequential toxicity identification evaluation (TIE) for characterizing toxicity of Venice Lagoon sediments: Comparison of

two different approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, p. 538–545, 2009.

PIRES, L. E. B.; BOHRER-MOREL, M. B. Toxicity Identification Evaluation (TIE): uma nova abordagem no monitoramento ambiental de efluentes industriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS AMBIENTAIS, 2, 2000, Santos, SP. Anais. Santos, 2000.

PLAA, G.L. (1982) Present status: toxic substances in the environment. *Can. J. Physiology and Pharmacology*, 60: 1010 – 1016.

POLEZA, F. **Avaliação da qualidade do sedimento do baixo estuário do rio Itajaí-Açu (SC) através de testes de toxicidade crônica**. Dissertação, Universidade do Vale do Itajaí, 2010.

PORTO DO RECIFE. Infra Estrutura.

Disponível em: <[www.portodorecife.pe.gov.br/infra](http://www.portodorecife.pe.gov.br/infra)> Acesso em: 30/01/2018.

PRITCHARD, D. W., 1967. What is an Estuary: Physical Viewpoint. In: G. H. Lauff (Ed.); *Estuaries*. p.83. Washington DC: American Association for the Advancement of Science.

RACHID, B. R. F. Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista. Apresentada como tese de Doutorado ao Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2002. 286 p.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. In: RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. Washington: ed., Taylor & Francis, v. 2, v. 1, cap. 1, 1995.

RESENDE, J. S. S.; CRAVEIRO, N. J. A.; PEREIRA, R. Análise granulométrica e do teor de matéria orgânica em sedimentos do estuário do rio Capibaribe – Pe. *Estudos Geológicos*. v. 26. n. 2. p. 34-45, 2016.

RIVELES, K.; GESBERG, R. M. Toxicity Identification Evaluation of Wet and dry weather runoff from the Tijuana river Watersher. *Bulletion Environmental Contamination Toxicology*. n. 63, p. 625-632, 199.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. In: Morales, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Ottawa, Eds. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004.

RODRÍGUEZ-OBESO, O., ALVAREZ-GUERRA, M., ANDRÉS, A., DELVALLS, T.A., RIBA, I., MARTÍN- DÍAZ, M.L., VIGURI, J.R., Monitoring and managing sediment quality and impact assessment in Spain in the past 10 years. *Trends Anal. Chemistry*, v. 26, p. 252–260, 2007.

SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U. **Metals in hydrocycle**. Berlin: Spring-Verlag, 1984.

SAMSON, J. C, GOODRIDGE, R., OLOBATUYI, F., WEIS, J. S. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquatic Toxicology*. v. 51, p. 369-376, 2001.

SANTOS T.G. Dinâmica da biomassa fitoplanctonica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife, PE). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v.4, n.1, p. 95-109, jan. 2009.

SARNA, V. V. S. S., ARYA, J., SUBBAIAH, C. V., NAIDU, S. A., GAWADE, L., KUMAR, P. P., REDDY, N. P. C. Stable isotopes of carbon and nitrogen in suspended matter and sediments from the Godavari estuary. *Journal of Oceanography*, v. 68, n. 2, p. 307–319, 2012.

SAUER, T. D.; HELDER, J. C.; BROWN, J. S. Toxicity identification evaluations of produced water effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, n. 10, p. 2020–2028, 1997.

SCHETTINI C. S. F., Caracterização Física do Estuário do Rio Itajai-Açu, SC. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*. v. 7, n. 1, p.123-142, 2002.

SCHETTINI, C. A. F.; MIRANDA, J. B.; VALLE-LEVINSON, A.; TRUCCOLO, E. C.; DOMINGUES, E. C. The circulation of the lower Capibaribe Estuary (Brazil) and its implications in the transport of scalars. *Journal of Oceanography (Online)*, v. 64, p. 1- 1, 2016.

SEDNET – *European Sediment Research Network*, The SedNet strategy paper. 2003. Disponível em: [www.sednet.org](http://www.sednet.org). Acessada em novembro, 2017.

SCHOLZ, S., FISCHER, S., GÜNDEL, U., KÜSTER, E., LUCKENBACH, T., VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment — applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*. v.15, p. 394–404, 2008.

SCHUBEL, J.; CARTER, H. Estuary as a Filter for Fine-Grained Suspended Sediment. *The Estuary as a Filter*, Academic Press, p. 81-105, 1984.

SILVA, H.K.P. **Concentrações de metais pesados nos sedimentos do estuário do rio Capibaribe, na Região Metropolitana do Recife (RMR) – Pernambuco, Brasil.** Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SILVA, H.K.P.; MACEDO S.J.; BRAYNER. F.M.M. Avaliação das concentrações de metais-traço e suas interações nos sedimentos e biota do parque dos manguezais, região metropolitana do Recife (RMR) Pernambuco, Brasil. *Tropical Oceanography*, Recife, v. 38, n. 2, p. 174-180, 2010.

SMAYDA, T.J. The phytoplankton of estuaries. In: KETCHUM, B.H. Estuaries and enclosed seas. *Elsevier*, p. 65-102, 1983.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia marinha: Histórico. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M.; **Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações para o Brasil.** São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 9-14p, 2002.

SOUSA, E.C.P.M. **12 anos de monitoramento ecotoxicológicos na área de disposição de um terminal petrolífero no Litoral Norte do Estado de São Paulo.** Tese, Universidade de São Paulo. 146 p, 2013.

SPIRITA, S. V.; AHILA, A. J. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio rerio*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, v. 3, n. 6, p. 6–11, 2015.



STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F., Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). *Nature*. v. 291, p. 293–296, 1981.

TESOLIN, G. A. S.; MARSON, M. M.; JONSSON, C. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; FRANCO, D. A. de S.; ALMEIDA, S. D. B. de; MATALLO, M. B.; MOURA, M. A. M. de. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). *O Mundo da Saúde*, São Paulo – v. 38(1), p. 86-97, 2014.

THOMAS, K. V; BENSTEAD, R. E.; THAIN, J. E.; WALDOCK, M. J. Toxicity Characterization of Organic Contaminants in Industrialized UK Estuaries and Coastal Waters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 38, n. 10, p. 925–932, 1999.

TOKUNAGA, S.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Plant lignan secoisolariciresinol suppresses pericardial edema caused by dioxin-like compounds in developing zebrafish: Implications for suppression of morphological abnormalities. *Food and Chemical Toxicology*. v. 96, p. 160-166, 2016.

TOLOSA, I.; MORA, S. DE; SHEIKHOESLAMI, M. R.; et al. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, n. 1–2, p. 44–60, 2004.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 1, p. 151-173, 1977.

UNCLES, Reg J. Estuarine physical processes research: Some recent studies and progress. *Estuarine Coastal Shelf Science*, v. 55, p. 829–856, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA600/6-91/003: **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations - Phase I: Toxicity Characterization Procedures**, 1991.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA/600/R-92/080: **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations - Phase II: Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity**, 1993a.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA/600/R-92/081: **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation - Phase III: Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity**, 1993b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA/600/R-096/054: Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE), Guidance Document, 1996.

VALENÇA, A.P.M.C. As comunidades macrobentônicas na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco. *Tropical Oceanography*. v. 37, n. 1-2, p. 80-99, 2009.

WAGENER, A., HAMACHER, C., FARIAS, C., GODOY, J. M., SCOFIELD, A. Evaluation of tools to identify hydrocarbon sources in recent and historical sediments of a tropical bay. *Marine Chemistry*, v. 121, n. 1-4, p. 67–79, 2010.

WANG, X. C., SUN, S., MA, H. Q., LIU, Y. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Jiaozhou Bay, Qingdao, China. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 2, p. 129–138, 2006.

WATANABE, H.; NAKAJIMA, F.; KASUGA, I.; FURUMAI, H. Application of whole sediment toxicity identification evaluation procedures to road dust using a benthic ostracod *Heterocypris incongruens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 89, p. 245–251, 2013.

WATSON, F. L.; SCHMIDT, H.; TURMAN, Z. K.; HOLE, N.; GARCIA, H.; GREGG, J.; TILGHMAN, J.; FRADINGER, E. A. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 33, p. 1337-1345, 2014.

WOOTTON, R. J. **Ecology of teleost fishes**. FISH AND FISHERIES SERIES 1. Chapman and Hall, New York, 404p. 1990.

XIA, X.; WANG, R. Effect of sediment particle size on polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: importance of the sediment-water interface. *Environmental toxicology and chemistry*. v. 27, n. 1, p. 119–125, 2008.

YI, X.; KIM, E.; JO, H.; HAN, T.; JUNG, J. et al. A comparative study on toxicity identification of industrial effluents using *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 87, n. 3, p. 319–23, set. 2011.

ZAGGATO, P. A., BERTOLETI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos – SP, 2ª ed., 486 p., 2006.

ZANARDI-LAMARDO, E; NOBREGA, A. S. C.; SANTOS, R. H. A.; MACIEL, D. C. Fontes e níveis de contaminação do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). *Tropical Oceanography*. vol. 44, n.2, p. 118-131, 2016.

ZHANG, L.; LI, Q.; CHEN, L.; ZHANG, A.; HE, J.; WEN, Z.; WU, L. Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* SP. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 112, p. 137-143, 2015