

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Aprimoramento de método com náuplios de *Tisbe biminiensis*  
(Copepoda: Hartacticoida) e sua utilização no estudo de Avaliação e  
Identificação da Toxicidade das águas do complexo estuarino de Suape

Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante

Recife

2014

Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante

Aprimoramento de método com náuplios de *Tisbe biminiensis*  
(Copepoda: Hartacticoida) e sua utilização no estudo de Avaliação e  
Identificação da Toxicidade das águas do complexo estuarino de Suape

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Oceanografia da Universidade Federal  
de Pernambuco, como parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de Doutora em Oceanografia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lília Pereira de Souza Santos

Recife

2014

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

L414a	<p>Lavorante, Beatriz Regina Brito de Oliveira. Aprimoramento de método com náuplios de <i>Tisbe biminiensis</i> (Copepoda:Hartacticoida) e sua utilização no estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade das águas do complexo estuarino de Suape./ Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante - Recife: O Autor, 2014. 159 folhas, il., e tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2014. Inclui Referências e Anexos.</p> <p>1. Oceanografia. 2. Poluição Marinha. 3. Toxicidade da Água. 4. AIT. 5. Copépodo. 6. Porto. I. Santos, Lília Pereira de Souza (Orientadora). II. Título.</p> <p>UFPE</p> <p>551.46 CDD (22. ed.)</p> <p>BCTG/2014-329</p>
-------	--

Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante

“Aprimoramento de método com náuplios de *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Hartacticoida) e sua utilização no estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade das águas do complexo estuarino de Suape”

Banca Examinadora:

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Lília Pereira de Souza Santos (Orientadora) - Presidente  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri – Titular Externo  
Universidade Federal de São Paulo

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Maria V. de Araújo de Castro – Titular Externo  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho – Titular Externo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Eliete Zanardi Lamardo – Titular Interno  
Universidade Federal de Pernambuco

Tese defendida e aprovada em 29 de Agosto de 2014.

Dedico aos meus pais, Eduardo (*in memoriam*)  
e Rute, ao meu esposo André e à minha  
florzinha Clara.

## AGRADECIMENTOS

Nossa, enfim os agradecimentos da tese. Como é imensa a significância destes anos nas nossas vidas. Foram momentos vividos com muita intensidade, momentos de alegrias e de descobertas, mas também de cansaço e ansiedade. Como é bom poder agradecer às muitas pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e, porque não, deste sonho que um dia pareceu tão distante e inatingível.

Quero inicialmente agradecer a Deus, sem Ele eu não teria forças para prosseguir a cada etapa da minha vida. Obrigada por sonhar comigo, pelo seu zelo e amor.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lília Pereira de Souza Santos, pela oportunidade ímpar de realizarmos este trabalho e por contribuir para a minha formação como pesquisadora. Muito obrigada pelos ensinamentos e por sempre acreditar em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, por contribuir para meu crescimento intelectual e profissional.

Ao CNPq por ter concedido minha bolsa de doutorado e financiamento ao projeto vinculado a esta tese.

À Dr<sup>a</sup>. Cintia Badaró pela amizade e por ter iniciado esse caminho do estudo da Avaliação e Identificação da Toxicidade comigo, fundamental para o andamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmilson Lima e ao Engenheiro Isaac pela estrutura e ajuda nas coletas em Suape.

Ao Prof. Dr. Manoel Flores pelo incentivo e bom humor e pela disponibilidade de estrutura e reagentes para realização de alguns testes, incluindo as análises de amônia.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Eliete Zanardi pelas análises de hidrocarbonetos aromáticos das amostras de Suape e pelas sugestões sempre tão bem vindas.

Ao Prof. Dr. André Lavorante pela disponibilidade de equipamento para as análises do zinco nas soluções do teste de referência.

Aos professores que contribuíram com sugestões para melhoria deste trabalho, em especial ao Dr. Gilvan Yogui, Dr. Paulo Carvalho, Dr. Paulo Santos e Dr. Alex Moraes.

À minha filha Clara e ao meu marido André que suportaram minhas ausências e angústias, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Às mulheres que se tornaram um exemplo para mim, Ana Rita Galvão (Voíta), Ana Galvão, Zélia Oliveira (*in memoriam*) e Ângela Oliveira.

Agradeço também à minha família, Rute (mãe), Henrique (irmão), Thammy (Cunhada), Letícia e Eduarda (sobrinhas), Juraci (Padrasto), Edmundo (avô), Orides (sogro), Helena (sogra), Suellen (prima-irmã) e a todas às minhas tias e tios, primos, cunhados e cunhadas. Infelizmente, não poderei citar o nome de todos, mas obrigada pela torcida e por terem me apoiado em todos os momentos.

Aos meus amigos...

Do LACE, aos que já passaram ou ainda permanecem, Bruno Varella, Cristiane Araújo Castro, Aurellyana Ribeiro, Deloar Oliveira, Roberta Silfrônio, Cristiane Ferraz, Cíntia Glasner, Anny Gabrielly, Rafaela Souza, Raquel Gentile, Nancilda Barros, Arivânia Oliveira, Tércio Alves, Matheus Araújo, Ramon e Bárbara Barkokebas, sou grata por todo apoio e carinho, pelo companheirismo nas horas mais desesperadas e pelas risadas, que não foram poucas e que tornaram o trabalho mais colorido.

Do Depto. de Oceanografia, Daniele Maciel, Keila Travassos e Pedro Melo, pela ajuda nos momentos de dúvida e suporte em alguns ensaios e aos técnicos e funcionários, em especial a Camilla Lima e Myrna Lins.

Do ITEP, Éden Albuquerque, Cláudia Neves e Sônia Valéria Pereira. Estas últimas me incentivaram desde o primeiro estágio, passando pela iniciação científica. Vocês são exemplo de força e garra. Obrigada a todos do ITEP que contribuíram com seus ensinamentos e principalmente pela amizade.

Da Escola Olinto Victor e da Escola Paulo de Souza Leal, pelo apoio, amizade e convívio nesta caminhada.

Aos amigos que a vida me proporcionou, do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UFPE entrada 2000.1 (Luzia Valença, Eduardo Araújo, Rodrigo Baraúna, Érika Valente, Anderson Bastos, Gilson Freitas, Graziella Gattai) e de outras jornadas (Silvana Soares, Lorena Malzoni, Maria da Paz, Suely Bezerra), foi muito importante ter vocês comigo.

À minha amiga-irmã Paloma Santos pela amizade e incentivo há tantos anos.

E a todas as pessoas que passaram no meu caminho e contribuíram de alguma forma para que esta conquista se tornasse possível: **Muito Obrigada!**

De tudo, ficaram três coisas:  
a certeza de que estamos sempre começando,  
a certeza de que é preciso continuar e  
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de  
terminar.  
Façamos da interrupção um caminho novo.  
Da queda, um passo de dança.  
Do medo, uma escada.  
Do sono, uma ponte.  
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

## RESUMO

O Complexo Industrial Portuário-SUAPE, localizado no complexo estuarino de Suape (Pernambuco, Brasil), conta com grandes empresas das mais diversas atividades produtivas. A região possui grande importância ecológica e econômica e estudos relatam a ocorrência de modificações fisiográficas, hidrológicas e ecológicas desde a implantação de SUAPE. Segundo estudos ecotoxicológicos realizados, a área apresenta contaminação moderada e variável. Contudo, ainda não foi possível indicar quais substâncias poderiam estar relacionadas com a toxicidade das amostras ambientais. Neste sentido, o teste de Avaliação e Identificação da Toxicidade – AIT surge como uma importante ferramenta, pois permite a identificação de contaminantes potencialmente causadores da toxicidade. O emprego de um ensaio ecotoxicológico rápido com um organismo-teste sensível antes e após as manipulações de AIT é necessário para este tipo de análise. Os náuplios de copépodos, dentre estes o da espécie *Tisbe biminiensis*, têm sido indicados para avaliação de amostras de água marinha devido a maior sensibilidade dos estágios larvais, porém o teste normalmente é realizado em microplacas o que o torna bastante laborioso. Este trabalho teve como objetivos aprimorar um protocolo para realização de bioensaios com náuplios de *T. biminiensis* e avaliar sua sensibilidade usando uma substância de referência, no caso o sulfato de zinco. Posteriormente, o teste foi empregado na avaliação da toxicidade de amostras de água superficial coletadas em diferentes pontos de Suape entre os anos de 2011 e 2013. Visando aumentar a sensibilidade do método, além dos parâmetros de mortalidade, desenvolvimento e inibição, também foram avaliados tamanho e estágio de desenvolvimento dos copepoditos. Para AIT foram estudadas amostras de água superficial coletadas em Abril e Setembro de 2013, sendo realizadas análises químicas de metais, amônia, hidrocarbonetos e agrotóxicos neste último mês. O tempo de duração do teste foi definido em 72 horas. Os testes de alimentação utilizando as microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Thalassiosira fluviatilis* com e sem adição de ração para peixe demonstraram o pior desempenho de *T. fluviatilis* sem adição de ração como alimento. Foi verificado que o desenvolvimento nas concentrações de *C. gracilis* superiores a  $2,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram estatisticamente maiores do que controle (água do mar sem adição de alimento) quando na temperatura de  $28^\circ\text{C}$  após 72 h. Entretanto a  $25^\circ\text{C}$  após 72 horas, apenas a partir da concentração de  $5,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *C. gracilis*, o desenvolvimento dos náuplios para copepoditos foi superior ao controle, indicando que a temperatura de  $28^\circ\text{C}$  promove maior desenvolvimento. Logo, foram definidas as seguintes condições para o teste: concentração de *C. gracilis* de  $2,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , temperatura de  $28^\circ\text{C}$  e um tempo de 72 h. Após os sete testes de sensibilidade foram estimadas as  $\text{CE}_{50/72\text{h}}$ ,  $\text{CL}_{50/72\text{h}}$  e a CENO em  $3,25 \pm 0,59$ ;  $3,46 \pm 0,72$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  para o  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , indicando que os náuplios de *T. biminiensis* são tão sensíveis quanto outros copépodos frequentemente empregados em estudos ecotoxicológicos. Avaliando-se amostras de água superficial coletadas na região de Suape verificou-se a presença de toxicidade sub-letal para os náuplios de *T. biminiensis*, mais associada ao mês de Setembro, início do período seco. Dentre os parâmetros avaliados, a inibição foi o que mais indicou toxicidade, seguido pelo desenvolvimento. Apesar da obtenção das medidas dos comprimentos total e da cabeça (geral e por estágio de copepoditos) e da frequência de estágios reduzirem a praticidade do método, em um dos pontos de coleta elas aumentaram a detecção de efeitos tóxicos. O estudo de AIT indicou que os compostos orgânicos, os metais e a amônia seriam os principais agentes causadores da toxicidade das águas de Suape, sendo os resultados da caracterização da fase I do AIT considerados bastante complexos. Nas análises químicas, os Hidrocarbonetos Aromáticos de Petróleo Dissolvidos ou Dispersos estavam em níveis subletais, os agrotóxicos não foram detectados e houve diminuição das concentrações de Fe após a macroalga *Ulva* sp. A adição de novos parâmetros no teste com náuplios *T. biminiensis* foi importante para confirmação dos resultados obtidos. A variedade de agentes tóxicos indicados pode ser atribuída à diversidade de atividades realizadas na área, às diferentes influências sofridas pelos pontos estudados e ao regime de chuvas, marés e correntes, indicando a necessidade de monitoramento e avaliação constantes das condições ambientais da região.

Palavras-Chave: Poluição Marinha, Toxicidade da Água, AIT, Copépodo, Porto.

## ABSTRACT

The Suape estuarine complex (Pernambuco, Brazil) is located close to the industrial port complex-SUAPE which includes major companies from various productive activities. The region has great ecological and economic importance, and studies have reported the occurrence of physiographic, hydrological and ecological changes since the implementation of SUAPE. According to ecotoxicological studies, the area has moderate and variable contamination. However, it has not yet been possible to indicate which substances could be related to the toxicity of environmental samples. In this sense, the test for Toxicity Identification and Evaluation - TIE emerges as an important tool because it allows the identification of possible toxic agents. The use of a fast ecotoxicological test with a sensitive test organism before and after the manipulations of TIE is required for this type of analysis. The copepod nauplii, among these the species *Tisbe biminiensis*, have been indicated for evaluation of samples of estuarine and sea water due to increased sensitivity of the larval stages, but the test is usually performed in microplates which makes it very laborious. This study aimed to improve a protocol for conducting bioassays with nauplii of *T. biminiensis* and evaluate their sensitivity to zinc sulphate, a reference substance. Subsequently, the test was used to evaluate the toxicity of surface water samples collected at different points of Suape between the years 2011 and 2013. Aiming to increase the sensitivity of the method, beyond the parameters of mortality, development and inhibition, size and stage of development of copepodites were also evaluated. For AIT were studied samples collected in April and September 2013, chemical analysis of metals, ammonia, hydrocarbons and pesticides were performed in the last month. The duration of the test was 72 h. The feeding test using microalgae *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira fluviatilis* with and without addition of fish ration showed the worst performance of *T. fluviatilis* as food. It was observed that the development *C. gracilis* concentrations above  $2.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  were significantly higher than control (sea water without the addition of food) when the temperature of 28 °C after 72 h. However, at 25 °C after 72 h, only at concentrations of  $5.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  *C. gracilis*, the development nauplii to copepodites were higher than the control, indicating that the temperature of 28 °C promotes further development. Then, the following conditions were established for the protocol: *C. gracilis* at  $2.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  as food, incubation at 28 °C and 72h duration. After the seven sensitivity tests were estimated  $CE_{50/72h}$ ,  $CL_{50/72h}$  and NOEC of  $3.25 \pm 0.59$ ;  $3.46 \pm 0.72$  and  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  for  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , indicating that the nauplii of *T. biminiensis* are as sensitive as other copepods employed in ecotoxicological studies. Was detected sub-lethal toxicity of surface water samples for the nauplii of *T. biminiensis*, more associated to September, early dry season. Among the parameters evaluated, inhibition was the most indicated toxicity, followed by the development. Despite obtaining measurements of the total length and head (general and by stage of copepodites) and the frequency of stages reduce the practicality of the method, one of the points, they increased the detection of toxic effects. The TIE study indicated that mainly organic compounds, metals and ammonia would be the toxicity agents of Suape waters, this characterization is considered complex. In chemical analysis, the HAPDDs were at sublethal levels, the pesticides were not detected and concentrations of Fe decreased after *Ulva* sp. The addition of new parameters in the test Nauplii *T. biminiensis* was important to confirm the results obtained. The variety of toxic agents can be attributed to the diversity of activities in the area, the different influences suffered by points studied and rainfall, tides and currents, indicating the need for constant monitoring and evaluation of environmental conditions in the region.

Key words: Marine Pollution, Water toxicity, TIE, Copepod, Port.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Newly hatched nauplii system.....	29
Figura 3.2	Percentage of development from <i>Tisbe biminiensis</i> nauplii into copepodites in different treatments with feeding with <i>Thalassiosira weissflogii</i> (T) or <i>Chaetocerus gracilis</i> (C) with and without fish ration (T+R, C+R) at 28 °C after 72 h; Different letters denote statistically significant difference ( $p < 0,05$ , Tukey's test).....	32
Figura 3.3	Percentage of development from <i>Tisbe biminiensis</i> nauplii into copepodites with different concentrations of <i>Chaetocerus gracilis</i> (cells mL <sup>-1</sup> ) at 25 °C (A) and 28 °C (B) after 72 h; Different letters denote statistically significant difference ( $p < 0,05$ , Tukey's test).....	33
Figura 3.4	Control chart with EC <sub>50</sub> and LC <sub>50</sub> values for <i>T. biminiensis</i> nauplii after exposure to different concentrations of ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; Dotted lines indicate limits referring to $\pm 2$ SD in function of mean line.....	35
Figura 3.5	Concentration-dependent curve (mean $\pm$ SD) in function of ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O. Percentage of development from <i>Tisbe biminiensis</i> nauplii into copepodites ( $\Delta$ ) and mortality ( $\square$ ).....	36
Figura 4.1	Distribuição dos pontos de coleta no complexo estuarino de Suape. Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 foram coletados nas campanhas de setembro de 2011 e março e junho de 2012. Os pontos P1.5, P2.5, P3.3, P3.8 a P0 foram coletados entre as campanhas de janeiro, abril e setembro de 2013. Modificado de Araújo e Souza-Santos (2013).....	46
Figura 4.2	Cartas-controle com os valores de CE <sub>50</sub> (A) e CL <sub>50</sub> (B) obtidos para <i>T. biminiensis</i> após exposição a diferentes concentrações do sulfato de zinco heptahidratado. Linhas pontilhadas indicam limites referentes a $\pm 2$ DP.....	53
Figura 4.3	Média $\pm$ erro-padrão do percentual de mortalidade dos náuplios de <i>Tisbe biminiensis</i> no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.....	55
Figura 4.4	Média $\pm$ erro-padrão do percentual de desenvolvimento dos náuplios de <i>Tisbe biminiensis</i> no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.....	56

Figura 4.5	Média $\pm$ erro-padrão do percentual de inibição dos náuplios de <i>Tisbe biminiensis</i> no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.....	57
Figura 4.6	Regressão linear entre o comprimento total e da cabeça para copepoditos de <i>Tisbe biminiensis</i> obtidos nos controles dos meses de Abril e Setembro de 2013.....	59
Figura 4.7	Médias do comprimento total e da cabeça para os copepoditos de <i>Tisbe biminiensis</i> nos diferentes estágios de desenvolvimento nos controles em Abril (A) e Setembro (B) de 2013.....	60
Figura 4.8	Médias dos comprimentos dos copepoditos de <i>T.biminiensis</i> em diferentes estágios de desenvolvimento. Comprimento da cabeça (A) e total (B) dos copepoditos expostos às amostras do mês de Abril. Comprimento da cabeça (C) e total (D) dos copepoditos expostos às amostras de Setembro de 2013....	62
Figura 4.9	Composição percentual das amostras e do controle em relação ao estágio de desenvolvimento dos copepoditos de <i>T. biminiensis</i> nos meses de Abril (A) e Setembro (B) de 2013. (*) Diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ).....	64
Figura 5.1	Distribuição dos pontos P0, P1.5 e P3.8 no complexo estuarino de Suape coletados em Abril e Setembro de 2013. Modificado de Araújo e Souza-Santos (2013).....	78
Figura 5.2	Resumo esquemático dos procedimentos realizados no estudo de AIT nas amostras coletadas em Suape empregando o ensaio com náuplios de <i>T. biminiensis</i> .....	83
Figura 5.3	Cartas-controle com os valores de CE <sub>50</sub> (A) e CL <sub>50</sub> (B) obtidos para <i>T. biminiensis</i> nos 20 testes de exposição ao sulfato de zinco heptahidratado nos capítulos 1 (1 a 7), 2 (8 a 12) e 3 (13 a 20). Linhas pontilhadas indicam limites referentes a $\pm 2$ DP.....	87
Figura 5.4	Comprimento médio das cabeças dos copepoditos antes e após as manipulações das amostras coletadas em Suape em Abril, (A) P1.5 e (B) P3.8, e em Setembro de 2103, (C) P0 (D) P1.5 e (E) P3.8. (*) Indica diferença redução significativa da toxicidade, (T) indica aumento significativo de toxicidade em relação ao <i>baseline</i> , teste t ( $p \leq 0,05$ ).....	95

- Figura 5.5 Frequência de estágios de desenvolvimento dos copepoditos de *T. biminiensis* no estudo de AIT com amostras do P1.5 (A) e P3.8 (B), mês de Abril, e do P0 (C), P1.5 (D) e P3.8 (E), mês de Setembro de 2013. (\*) Diferença estatística significativa e (T) indica aumento significativo de toxicidade em relação ao *baseline* utilizando teste G ( $p \leq 0,05$ )..... 102
- Figura 5.6 Análise dos Componentes Principais (ACP) das variáveis hidrológicas (pH, SAL = salinidade,  $\text{NH}_3$  = amônia não-ionizada e OD = oxigênio dissolvido), químicas (metais [Al, Fe, Mn, Zn, V] e NAT) e dos parâmetros ecotoxicológicos para os náuplios de *T. biminiensis* (MOR=mortalidade, DES=desenvolvimento, INI=inibição, CC=comprimento médio da cabeça, CC2= no estágio C2, CC3=no estágio C3 e CC4=no estágio  $\geq$  C4) obtidas nos P0, P1.5 e P3.8 coletados em Setembro de 2013 antes (*baseline*) a após o tratamento com *Ulva* sp..... 109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	EC <sub>50</sub> and LC <sub>50</sub> values in function of Zn (mg L <sup>-1</sup> ) for different organisms in toxicity tests.....	38
Tabela 4.1	Coordenadas geográficas dos pontos coletados em Suape.....	47
Tabela 4.2	Resumo das condições do teste ecotoxicológico para amostras de água utilizando náuplios do copépodo <i>T. biminiensis</i> .....	48
Tabela 4.3	Resultados dos parâmetros físicos e químicos da água superficial coletada no complexo estuarino de Suape entre os meses de Setembro de 2011 e Setembro de 2013.....	52
Tabela 4.4	Resultados da ANOVA (F, $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) baseados nos parâmetros percentuais obtidos nos ensaios ecotoxicológicos com <i>T. biminiensis</i> utilizando amostras de água superficial de Suape coletada entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013.....	58
Tabela 4.5	Resultados da ANOVA (F, $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) baseados nas médias dos comprimentos total e da cabeça ( $\mu\text{m}$ ) dos copepoditos de <i>T. biminiensis</i> observados nos ensaios com amostras de água superficial de Suape coletadas nos meses de Abril e Setembro de 2013.....	61
Tabela 4.6	Resultados da ANOVA (F, $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) obtidos a partir das médias de comprimento total e da cabeça para cada estágio de copepoditos observado ao final dos ensaios ecotoxicológicos com <i>T. biminiensis</i> com as amostras de Suape coletadas nos meses de Abril e Setembro de 2013.....	63
Tabela 4.7	Resumo dos resultados da toxicidade das amostras coletadas no complexo estuarino de Suape para os diferentes parâmetros avaliados no teste com o copépodo <i>T. biminiensis</i> .....	65
Tabela 5.1	Concentrações de EDTA e de tiosulfato de sódio (mg L <sup>-1</sup> ) que afetaram/inibiram ou foram letais aos náuplios de <i>T. biminiensis</i> .....	88
Tabela 5.2	Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de Abril de 2013 da amostra ambiental bruta, <i>baseline</i> (após ajuste de salinidade e sem as manipulações) e após as manipulações da fase I do estudo de AIT.....	89

Tabela 5.3	Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de Setembro de 2013 da amostra ambiental bruta, <i>baseline</i> (após ajuste de salinidade e sem as manipulações) e após as manipulações da fase I do estudo de AIT.....	90
Tabela 5.4	Médias ( $\pm$ SD) dos percentuais de mortalidade, desenvolvimento e inibição dos náuplios de <i>T. biminiensis</i> obtidas nas manipulações do estudo de AIT com amostras de água superficial de Suape coletadas em Abril de 2013.....	92
Tabela 5.5	Médias ( $\pm$ SD) dos percentuais de mortalidade, desenvolvimento e inibição dos náuplios de <i>T. biminiensis</i> obtidas nas manipulações do estudo de AIT com amostras de água superficial de Suape coletadas em Setembro de 2013.....	93
Tabela 5.6	Médias ( $\pm$ SD) do comprimento da cabeça ( $\mu$ m) por estágio de copepoditos de <i>T. biminiensis</i> observados ao final das manipulações do estudo de AIT com as amostras de água superficial coletadas em Suape em Abril de 2013.....	97
Tabela 5.7	Médias ( $\pm$ SD) do comprimento da cabeça ( $\mu$ m) por estágio de copepoditos de <i>T. biminiensis</i> observados ao final das manipulações do estudo de AIT com as amostras de água superficial coletadas em Suape em Setembro de 2013.....	98
Tabela 5.8	Frequência (C1:C2:C3:C4 em %) de estágios de copepoditos de <i>T. biminiensis</i> antes e após as manipulações de AIT com amostras coletadas em Suape em Abril de 2013.....	99
Tabela 5.9	Frequência (C1:C2:C3:C4 em %) de estágios de copepoditos de <i>T. biminiensis</i> antes e após as manipulações de AIT com amostras coletadas em Suape em Setembro de 2013.....	100
Tabela 5.10	Síntese dos resultados obtidos no estudo de AIT com as amostras de Suape coletadas em Abril de 2013 utilizando o teste com náuplios de <i>T. biminiensis</i> e os parâmetros de Mortalidade (M), Desenvolvimento (D), Inibição (I), Comprimento Médio da Cabeça (CM), Comprimento Médio por Estágio (CME) e Frequência dos Estágios (FE).....	103

Tabela 5.11	Síntese dos resultados obtidos no estudo de AIT com as amostras de Suape coletadas em Setembro de 2013 utilizando o teste com náuplios de <i>T. biminiensis</i> e os parâmetros de Mortalidade (M), Desenvolvimento (D), Inibição (I), Comprimento Médio da Cabeça (CM), Comprimento Médio por Estágio (CME) e Frequência dos Estágios (FE).....	104
Tabela 5.12	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de NAT nas amostras de água coletadas em Setembro de 2013 antes e depois do tratamento com <i>Ulva</i> sp.....	106
Tabela 5.13	Concentração de metais totais nas amostras de água ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e algas ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) antes e depois da manipulação de AIT com <i>Ulva</i> sp.....	107
Tabela 5.14	Indicação dos possíveis agentes tóxicos causadores da toxicidade após o estudo de AIT realizado com as amostras coletadas em Abril (A) e Setembro (S) de 2013 na área de Suape.....	113

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
3	<b>CAPÍTULO I</b> .....	24
3.1	<b>Abstract</b> .....	25
3.2	<b>Introduction</b> .....	26
3.3	<b>Materials and Methods</b> .....	28
3.3.1	<i>Acquisition and cultivation of copepods and microalgae</i> .....	28
3.3.2	<i>Acquisition of nauplii</i> .....	28
3.3.3	<i>Description of test</i> .....	29
3.3.4	<i>Toxicity test conditions with <i>T. biminiensis</i> nauplii</i> .....	29
3.3.5	<i>Determination of zinc sulphate heptahydrate concentration</i> .....	30
3.3.6	<i>Sensitivity of nauplii to zinc sulphate</i> .....	30
3.3.7	<i>Statistical analysis</i> .....	31
3.4	<b>Results</b> .....	31
3.4.1	<i>Conditions of toxicity test with <i>T. biminiensis</i> nauplii</i> .....	31
3.4.2	<i>Determination of zinc sulphate concentration</i> .....	33
3.4.3	<i>Sensitivity of nauplii to zinc sulphate</i> .....	34
3.5	<b>Discussion</b> .....	36
3.6	<b>Conclusion</b> .....	39
4.	<b>CAPÍTULO II</b> .....	40
4.1	<b>Resumo</b> .....	41
4.2	<b>Introdução</b> .....	42
4.3	<b>Material e Métodos</b> .....	45
4.3.1	<i>Área de estudo</i> .....	45
4.3.2	<i>Coleta e acondicionamento das amostras</i> .....	46
4.3.3	<i>Obtenção e cultivo dos copépodos e das microalgas</i> .....	47
4.3.4	<i>Obtenção de náuplios para o teste</i> .....	47
4.3.5	<i>Descrição do teste</i> .....	48
4.3.6	<i>Observação dos estágios de desenvolvimento e crescimento</i> .....	49
4.3.7	<i>Testes com substância de referência</i> .....	50
4.3.8	<i>Análise Estatística</i> .....	50
4.4	<b>Resultados</b> .....	51
4.4.1	<i>Parâmetros físicos e químicos</i> .....	51
4.4.2	<i>Sensibilidade à substância de referência</i> .....	52
4.4.3	<i>Amostras ambientais</i> .....	54
4.4.4	<i>Avaliação do crescimento e do estágio de desenvolvimento dos copepoditos</i> .....	58
4.5	<b>Discussão</b> .....	65
4.6	<b>Conclusão</b> .....	71
5.	<b>CAPÍTULO III</b> .....	72
5.1	<b>Resumo</b> .....	73
5.2	<b>Introdução</b> .....	74

5.3	<b>Material e Métodos</b> .....	77
5.3.1	<i>Área de estudo, coleta e acondicionamento das amostras</i> .....	77
5.3.2	<i>Obtenção e cultivo dos copépodos e das microalgas</i> .....	78
5.3.3	<i>Descrição do teste com náuplios</i> .....	79
5.3.4	<i>Observação dos estágios de desenvolvimento e do crescimento</i> .....	79
5.3.5	<i>Avaliação e Identificação de Toxicidade – AIT</i> .....	79
5.3.5.1	Sensibilidade dos náuplios do copépodo <i>T. biminiensis</i> aos reagentes do AIT.....	79
5.3.5.2	Caracterização da toxicidade.....	80
5.3.6	<i>Análises Químicas</i> .....	84
5.3.7	<i>Análise Estatística</i> .....	85
5.4	<b>Resultados</b> .....	86
5.4.1	<i>Sensibilidade à substância de referência</i> .....	86
5.4.2	<i>Sensibilidade dos náuplios do copépodo T. biminiensis aos reagentes do AIT</i> .....	88
5.4.3	<i>Parâmetros físico-químicos antes e após as manipulações de AIT</i> .....	88
5.4.4	<i>Caracterização da toxicidade da água superficial de Suape</i> .....	91
5.4.4.1	Desenvolvimento, Inibição e Mortalidade (%).....	91
5.4.4.2	Comprimento da cabeça dos copepoditos geral e por estágio.....	94
5.4.4.3	Frequência dos estágios de desenvolvimento.....	99
5.4.5	<i>Análises Químicas</i> .....	106
5.4.5.1	Análise de Nitrogênio Amoniacal Total Dissolvido.....	106
5.4.5.2	Análise de HAPDDs.....	106
5.4.5.3	Análise de Metais.....	106
5.4.5.4	Análise de Agrotóxicos.....	108
5.4.6	<i>Análise dos Componentes Principais</i> .....	108
5.5	<b>Discussão</b> .....	110
5.5.1	<i>Teste com náuplios de T. biminiensis e sensibilidade à substância de referência</i> .....	110
5.5.2	<i>Sensibilidade dos náuplios de T. biminiensis aos reagentes do AIT</i> .....	111
5.5.3	<i>Estudo de AIT</i> .....	112
5.6	<b>Conclusões</b> .....	129
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	130
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	132
	<b>ANEXO</b> .....	159

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

---

As zonas costeiras abrigam grande parte da população mundial, e com o fenômeno de migração para as grandes cidades, a tendência é que essas regiões apresentem uma densidade populacional cada vez maior (SALE et al., 2008). Estimativas das Nações Unidas cogitam que as áreas costeiras abrigam mais de 50% da população mundial e projetam que, dentro de duas décadas, esse percentual atinja os 75% (UNITED NATIONS, 2004).

O aumento da concentração populacional, aliado ao modelo de desenvolvimento econômico baseado no uso crescente e descontrolado dos recursos naturais, causam as mais variadas pressões nas zonas costeiras. Estas regiões tornam-se susceptíveis a diversos impactos ambientais. Além destes fatores, a produção de bens e a geração de resíduos em áreas urbanizadas e não urbanizadas resultam no aporte de grandes quantidades de poluentes aos ecossistemas aquáticos (MOREIRA, 2009).

Os impactos gerados nas regiões costeiras, e em especial nos estuários, comprometem tanto a dinâmica litorânea quanto os interesses econômicos, podendo gerar desequilíbrio ecológico e riscos a saúde humana (DIAZ e ROSENBERG, 2008; SALE et al., 2008). Desta forma, estes espaços constituem zonas de conflito, onde os interesses econômicos competem com a manutenção da biodiversidade e atividades tradicionais, como a pesca artesanal e a recreação (DIAS et al., 2009).

Os estuários constituem a porção final do curso de um rio, ou um braço de mar, onde há mistura de água do mar com água doce e esta ocorre em local rodeado por terra (COELHO et al., 2004). Pritchard (1967) define os estuários como corpos d'água semi-fechados que têm uma conexão livre com o mar e que sofrem diluição da água do mar devido ao aporte de água doce de origem continental. Estas regiões apresentam grande importância ecológica por serem locais altamente produtivos e por ser o cenário para efetivação de etapas do ciclo de vida de várias espécies. Principalmente por sua localização e características geomorfológicas e hidrológicas, são ampla e diversamente utilizadas pelo homem, sendo consideradas áreas propícias para a construção de portos.

Localizado entre os municípios de Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca (Pernambuco, Brasil), o complexo estuarino de Suape conta com uma extensa linha paralela de recifes de arenito. Inicialmente, era composto pelos estuários dos rios Massangana, Tatuoca, Ipojuca e Merepe, mas com as diversas alterações provocadas após a implantação do Complexo Industrial Portuário de Suape Governador Eraldo Gueiros–SUAPE, apenas os rios

Massangana e Tatuoca permanecem com comunicação com a Baía de Suape (NEUMANN-LEITÃO e MATSUMURA-TUNDISI, 1998; KOENING et al., 2002).

As atividades portuárias estão diretamente ligadas ao desenvolvimento econômico, uma vez que grande parte das mercadorias comercializadas no mundo é transportada em navios e armazenada temporariamente em portos e terminais portuários (KITZMANN e ASMUS, 2006). A concepção da necessidade de construção de um porto no litoral Sul do Estado de Pernambuco surgiu na década de 50 sugerida pelo pesquisador econômico e social, Padre Louis Joseph Lebret (LEBRET, 2001). Após 20 anos, o plano de criação deste complexo portuário foi elaborado pelo Governo do Estado de Pernambuco com o objetivo de criar condições logísticas, tecnológicas e competitivas para o estado (KOENING et al., 2002), sendo considerada uma área potencialmente geradora de desenvolvimento econômico. A operação do então chamado Porto de Suape teve início em abril de 1984, quando foi realizado o primeiro embarque de álcool para a Petrobrás (GOVERNO DE PERNAMBUCO, 2014).

Atualmente, SUAPE conta com mais de 100 empresas em funcionamento e 50 em processo de implantação, dentre elas, importantes empreendimentos como os Estaleiros Atlântico Sul e Promar, a Refinaria Abreu e Lima, a Petroquímica Suape e o Pólo Poliéster. SUAPE movimentou aproximadamente 13 milhões de toneladas de carga no ano de 2013, destacando-se pelo variado perfil de produtos, como cargas containerizadas e os granéis líquidos (derivados de petróleo, produtos químicos, alcoóis, óleos vegetais etc), que representam quase 80% da movimentação (GOVERNO DE PERNAMBUCO, 2014).

As diversas atividades desenvolvidas nas regiões portuárias podem contaminar áreas de influência direta e indireta e representar riscos ambientais variados (BAUMGARTEN e NIENCHESKI, 1998). Fernandes (1999) afirma que várias são as fontes de contaminação que podem ser geradas dentro ou fora de SUAPE (carreadas para a região através dos rios) e que podem acarretar danos para a biota aquática e para saúde humana.

A avaliação dos efeitos tóxicos dos contaminantes aos organismos e o estabelecimento dos possíveis riscos para as comunidades aquáticas que habitam áreas críticas são objetivos da ecotoxicologia aquática (VIGANO et al., 2001). Os ambientes aquáticos constituem compartimentos frágeis dos quais a existência humana é dependente, sendo os estudos ecotoxicológicos, aliados às análises físicas e químicas, importantes ferramentas no monitoramento de áreas impactadas, servindo como embasamento para possíveis tomadas de decisão por parte de entidades competentes (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

De acordo com os estudos ecotoxicológicos realizados no complexo estuarino de Suape, o ambiente apresenta contaminação moderada e variável (OLIVEIRA, 2011;

ARAÚJO e SOUZA-SANTOS, 2013; SOUZA-SANTOS e ARAÚJO, 2013). Entretanto, ainda não foi possível relacionar a toxicidade com a presença de contaminantes químicos específicos nas amostras. Desta forma, estudos acerca dos tipos de contaminantes responsáveis pela toxicidade verificada na região são necessários para contribuir com o estabelecimento de medidas de controle para as fontes específicas, visando minimizar futuras alterações nas comunidades bióticas.

O teste de Avaliação e Identificação de Toxicidade – AIT ou TIE (do inglês: *Toxicity Identification Evaluation*) é um dos mais importantes procedimentos usados para indicar os agentes causadores da toxicidade em amostras ambientais (PHILLIPS et al., 2009). Estes testes se baseiam em submeter uma amostra a várias manipulações físicas e químicas que podem alterar sua toxicidade decorrente da diminuição da concentração ou remoção do agente tóxico (BADARÓ-PEDROSO e RACHID, 2002). No estudo de AIT, a toxicidade da amostras após as manipulações é comparada a toxicidade de uma amostra não manipulada. Os resultados da toxicidade são integrados a análises químicas e outras técnicas que podem levar a identificação da substância causadora da toxicidade.

Os procedimentos ou manipulações do teste de AIT geram frações tratadas da amostra que são submetidas a testes de toxicidade com um organismo-teste. Os efeitos dos testes toxicológicos sobre os organismos podem ser agudos (resposta rápida e brusca, sendo normalmente quantificados como imobilidade e/ou letalidade) ou crônicos (resposta após exposições mais longas, afetam o crescimento, reprodução, comportamento, longevidade). Os testes agudos são geralmente de curto prazo (1 a 4 dias) e os crônicos são típicos de longo prazo (10% do ciclo de vida do organismo) (LAWS, 2000).

Além dos aspectos gerais, como conhecimento da biologia, fisiologia, ecologia, abundância, obtenção, distribuição, cultivo e manutenção, a seleção dos organismos-teste para utilização nos estudos de AIT deve considerar atributos relacionados à sua sensibilidade e/ou rapidez e praticidade do método visando possibilitar a realização de grande número de ensaios com diferentes amostras e manipulações.

Copépodos harpacticóides são microcrustáceos sensíveis e bastante adequados para utilização em testes de toxicidade (COULL e CHANDLER, 1992). A espécie *Tisbe biminiensis* vem sendo utilizada em estudos ecotoxicológicos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia-LACE do Departamento de Oceanografia-DOCEAN da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE que confirmaram sua sensibilidade à substância de referência dicromato de potássio e a contaminantes presentes em amostras ambientais de água e sedimento (ARAÚJO-CASTRO, 2008; TORREIRO, 2010;

OLIVEIRA, 2011). Oliveira (2011) observou que o teste baseado no desenvolvimento dos náuplios do copépodo *T. biminiensis* apresentou sensibilidade semelhante ao do teste tradicional baseado no desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Entretanto, a autora considerou que o teste foi bastante laborioso por se basear na exposição de 90 náuplios para cada amostra, em três réplicas de 30 náuplios, contados individualmente e colocados em placas de 96 poços.

Desta forma, este estudo teve como objetivos aprimorar o teste de toxicidade com náuplios de *T. biminiensis*, bem como estimar sua sensibilidade mediante o uso de uma substância de referência, para utilizá-lo na avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais de origem marinha e estuarina, como as águas do complexo estuarino de Suape. Parâmetros ecotoxicológicos adicionais foram estudados posteriormente e o protocolo aprimorado foi aplicado no estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade de amostras tóxicas oriundas da região de Suape.

## 2 OBJETIVOS

---

### Capítulo I

#### Objetivo Geral

Definir as condições do ensaio com náuplios de *Tisbe biminiensis* para avaliação rápida e eficiente de amostras de águas de origem marinha e estuarina, bem como a sensibilidade destes organismos a uma substância de referência.

#### Objetivos Específicos

- Definir as condições de tempo de duração, alimentação e temperatura de incubação para o teste empregando náuplios de *T. biminiensis*.
- Realizar testes de toxicidade com a substância de referência sulfato de zinco heptahidratado para avaliar a sensibilidade de *T. biminiensis* e determinar a concentração letal (CL<sub>50</sub>) e a concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) para esta substância.

### Capítulo II

#### Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de amostras de água coletadas em Suape e nos estuários dos rios Massangana e Tatuoca durante os períodos seco e chuvoso utilizando o protocolo com náuplios do copépodo *T. Biminiensis*, bem como incluir novos parâmetros visando aumento da sensibilidade do teste.

#### Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade letal e subletal das amostras de água superficial coletadas em Suape em diferentes períodos entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013, contemplando os períodos seco e chuvoso utilizando o teste com náuplios de *T. biminiensis*.
- Verificar a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* utilizados nos testes ecotoxicológicos, empregando o sulfato de zinco heptahidratado como substância de referência.

- Avaliar a adição de novos parâmetros de desenvolvimento e de crescimento, visando aumentar a sensibilidade do ensaio com náuplios de *T. biminiensis*.
- Verificar se há relação entre os efeitos tóxicos sobre o copépodo *T. biminiensis* e os dados hidrológicos.

### **Capítulo III**

#### **Objetivo Geral**

Avaliar a toxicidade das águas da região do complexo estuarino de Suape utilizando o teste de Avaliação e Identificação Toxicológica – AIT em amostras coletadas em Abril e Setembro de 2013 utilizando náuplios do copépodo *T. biminiensis*.

#### **Objetivos Específicos**

- Avaliar a toxicidade do EDTA e do tiosulfato de sódio aos náuplios de *T. biminiensis* para estabelecer as concentrações a serem empregadas nas manipulações do estudo de AIT nas amostras coletadas em Suape.
- Verificar a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* utilizados nos testes ecotoxicológicos, empregando o sulfato de zinco heptahidratado como substância de referência.
- Aplicar a metodologia desenvolvida com náuplios de *T. biminiensis* na Avaliação e Identificação da Toxicidade dos contaminantes causadores da toxicidade na água superficial coletada na região estuarina de Suape.
- Indicar a classe do agente causador da toxicidade nas amostras de água superficial coletadas em Suape durante os meses de Abril e Setembro de 2013 empregando a fase I do estudo de AIT e os náuplios do copépodo *T. biminiensis* nos ensaios ecotoxicológicos.
- Identificar os possíveis agentes causadores da toxicidade nas amostras de água de Suape utilizadas no estudo de AIT da fase I, realizando alguns procedimentos da fase II do estudo de AIT, análises químicas das amostras sem tratamento e após algumas manipulações.
- Relacionar os resultados obtidos no estudo de AIT visando indicar os possíveis agentes responsáveis pela ocorrência de efeitos tóxicos sobre o *T. biminiensis* expostos às amostras de água de Suape.

### 3 CAPÍTULO I

---

A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of  
*Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida)\*

\*Capítulo publicado no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 95, p.52-59, 2013. Fator de Impacto: 2,203.

### 3.1 Abstract

Copepods are largely used in toxicity tests. The nauplii of these organisms are more sensitive to contaminants than the adult stage. The aim of the present study was to test a protocol for the use of nauplii of the copepod *Tisbe biminiensis* in the ecotoxicological assessment of seawater. The sensitivity of these organisms to zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) was also determined. The following conditions were established for the protocol based on the best development of nauplii to copepodites: 72-h duration, the microalga *Chaetocerus gracilis* at  $2,5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  as feed and incubation temperature of 28 °C. In the zinc sulphate sensitivity tests,  $\text{EC}_{50-72\text{h}}$  and  $\text{LC}_{50/72\text{h}}$  were  $3,25 \pm 0,59$  mg  $\text{L}^{-1}$  and  $3,46 \pm 0,72$  mg  $\text{L}^{-1}$ , respectively, as estimated by the final number of copepodites and total number of live animals in relation to the mean number of inoculated nauplii. The estimated NOEC was 2,0 mg  $\text{L}^{-1}$ . The test developed is fast and not labour intensive. *T. biminiensis* nauplii exhibit sensitivity to zinc sulphate similar to that of other species of copepods employed in water toxicity tests, demonstrating the usefulness of these organisms in ecotoxicological studies involving samples of environmental seawater.

Keywords: copepod, water toxicity, methodology, zinc sulphate, pollution

### 3.2 Introduction

The definition of an appropriate biological model is one of the most important steps in the development of ecotoxicological tests (KWOK et al., 2008). Despite the advantages of standardised toxicity tests involving species employed in studies throughout the world, the use of native species is indicated to express local field situations with greater particularity and safety (ZAGATTO and BERTOLETTI, 2008).

Harpacticoida is an order of microcrustaceans with characteristics that make these copepods suitable test organisms for the evaluation of toxicity in environmental samples (BROWN et al., 2005), such as their importance in the marine food chain, broad geographic distribution, small size and short lifecycle. Moreover, these copepods can be bred under laboratory conditions at low cost, which allows a continuous stock of organisms in different lifecycle stages. Some species exhibit epibenthic habits, which enables their use in toxicity tests involving water or sediment samples (KUSK and WOLLENBERGER, 2007).

Species of the genera *Tigriopus*, *Nitokra*, *Amphiascus*, *Acartia* and *Tisbe* are among the most frequently used copepods in ecotoxicological tests (GOURMELON and AHTIAINEN, 2007; RAISUDDIN et al., 2007). Copepods of the genus *Tisbe* are employed in toxicity tests on environmental samples as well as sensitivity tests involving different substances, especially the species *T. battagliai* (HUTCHINSON et al., 1994, 1999; SMITH et al., 1994; BECHMANN, 1999; BARATA et al., 2002; MACKEN et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; DIZ et al., 2009), *T. holothuriae* (VERRIOPOULOS and HARDOUVELIS, 1988; MILIOU et al., 2000; TAYLOR et al., 2012), *T. furcata* (BECHMANN, 1994; LOTUFO and FLEEGER, 1997) and *T. longicomis* (LARRAIN et al., 1998).

*Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco (1973) is a promising epibenthic harpacticoid copepod for use in ecotoxicological tests. This species has six larval or nauplius stages and five juvenile or copepodite stages before reaching the adult stage (VOLKMANN-ROCCO, 1973). *T. biminiensis* has been proposed as a test-organism for the ecotoxicological evaluation of sediment samples (ARAÚJO-CASTRO et al., 2009). In microplate tests, Araújo-Castro et al. (2006) found that *T. biminiensis* nauplii are more sensitive to potassium dichromate than ovigerous females. Huang et al. (2006) and Saiz et al. (2009) indicate the use of the larval stages of copepods in toxicity tests due to their greater sensitivity to contaminants in comparison to adults, which is an important characteristic for biological models employed in toxicity assays, especially those testing water samples *in situ*.

International protocols establish norms for the use of nauplii or juveniles of marine copepods in ecotoxicological tests. A regulated, short-term test is employed for the

determination of the lethal effect on adults or copepodites of the species *Acartia tonsa*, *Tisbe battagliai* and *Nitokra spinipis*, but only acute toxicity is evaluated (ISO, 1999). Other long-term tests use the complete lifecycle of organisms, such as *Amphiascus tenuiremis*, to observe reproductive, developmental and survival parameters (ASTM, 2004; OECD, 2011).

Although standardised tests with copepod nauplii are widely employed (HUTCHINSON et al., 1994; BECHMANN, 1999; HACK et al., 2008; KWOK et al., 2008; MOHAMMED et al., 2011), such methods are excessively labour intensive for ecotoxicological studies involving a large number of samples, since the transfer of organisms to each well of the microplate is performed individually.

According to Medina et al. (2002), it is possible to carry out short-term tests based on the complete cycle, since these tests are sensitive and have ecological importance. Assessing the sensitivity of copepods to different chemical substances, Gourmelon and Ahtiainen (2007) state that short-term effects on development may be more sensitive than long-term effects on reproductive aspects. A number of authors have proposed alternative methods for short-term tests with copepod nauplii that do not require microplates (ANDERSEN et al., 2001; MEDINA et al., 2002; HUANG et al., 2006; SAIZ et al., 2009).

The conditions used in bioassays are commonly tested with reference substances to allow determining the sensitivity of the organisms used as well as the reproducibility of the results. Zinc sulphate is often employed as a reference substance in toxicity tests with aquatic organisms. While zinc is an essential element subject to internal regulation in crustaceans, it can be toxic at relatively low levels, compromising physiological functions, such as respiration, osmoregulation, reproductive processes and behavioural aspects (MURTI and SHUKLA, 1984; VERRIOPOULOS and MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, 1989).

The aim of the present study was to determine the experimental conditions (test duration, type/concentration of food source and incubation temperature) to establish a new protocol for the assessment of seawater toxicity using nauplii of the copepod *T. biminiensis* and evaluate the sensitivity of these organisms using zinc sulphate as the reference substance. New seawater toxicity tests are very important to Brazil due to the fact that the most common organism used for marine toxicology, the sea urchin *Lythechinus variegatus*, is disappearing in some regions (IHARA et al. 2010). Furthermore, the fast, easy and not labour intensive protocol developed herein can be adapted for other copepod species.

### 3.3 Materials and Method

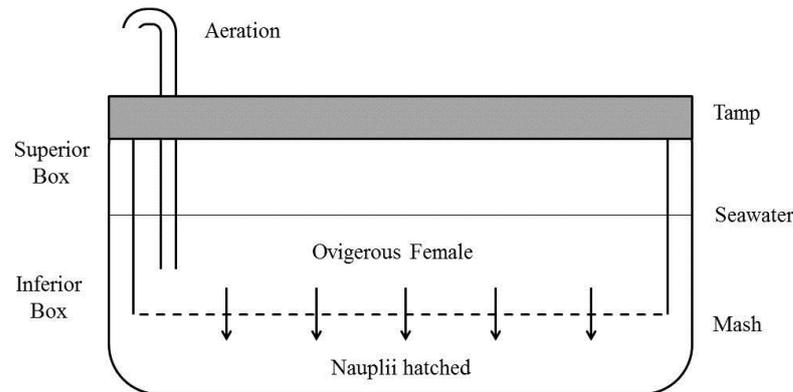
#### 3.3.1 Acquisition and cultivation of copepods and microalgae

The copepods (*T. biminiensis*) used to start the mass cultures were acquired from sediment and microalgae samples collected from Farol beach in the city of Olinda, state of Pernambuco, Brazil. Oviparous females were isolated and identified based on Volkmann-Rocco (1973). The offspring of all females confirmed as *T. biminiensis* were pooled to ensure genetic variability in the population. Copepod cultivation was performed using the method proposed by Ribeiro and Souza-Santos (2011) in plastic recipients containing seawater with salinity  $34 \pm 2$ , ambient temperature of  $28 \pm 2$  °C and a natural photoperiod of approximately 13/11 h light/dark under constant aeration. The seawater was previously filtered (25 and 5 µm), chlorinated with sodium hypochlorite and de-chlorinated with sodium thiosulphate. The copepods were fed the diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros gracilis* and a basic ration for ornamental fish (Alcon®).

The diatoms were cultivated at  $26 \pm 2$  °C, with a 12-h light/dark photoperiod in F/2 medium (GUILLARD, 1975) prepared in filtered seawater with Tris-HCl buffer. After sterilisation of the medium, a thiamine, biotin and cyanocobalamin vitamin solution, which was previously sterilised through filtration (0,22 µm), was added prior to inoculation. Microalgae were counted in a Neubauer chamber (cells mL<sup>-1</sup>).

#### 3.3.2 Acquisition of nauplii

For the ecotoxicological tests, newly hatched nauplii (maximum age: 24 h) were obtained from a two-tier system prepared one day prior to the test (Figure 3.1). A volume of 3 L of filtered seawater with microalgae was transferred to the system and left to rest for two hours for the sedimentation of the microalgae. Adult copepods from the maintenance cultures were sampled with a 250 µm sieve and added to the upper tier. The bottom of the upper tier was lined with a 120 µm mesh screen, allowing the adults to have contact with the water, but little access to the settled food to avoid the excessive production of faecal pellets. The hatched nauplii passed through the mesh and could feed in the lower tier. After 20 to 24 h, the entire contents of the lower tier were carefully poured through a 64 µm mesh sieve to retain the nauplii, which were then transferred to a beaker containing 200 mL of control seawater. The females were returned to the cultures. To estimate the volume of suspension to be transferred to each test recipient, three aliquots of 0,5 mL were withdrawn under homogenization and the number of nauplii was determined under a stereomicroscope.



**Figure 3.1-** Newly hatched nauplii system.

### 3.3.3 Description of test

Seawater for both control and dilution was collected 10.8 nautical miles from the coast of the Port of Recife, Pernambuco, Brazil (08°11'158" S and 34°42'486"W) and filtered through a 0.45 µm membrane. Salinity was adjusted to 34. Prior to the test, pH, salinity and dissolved oxygen were determined.

Flat-bottom glass test recipients (7 cm in diameter x 5 cm in height) containing 25 mL of test solution were used for each concentration/treatment and control. Four replicates were used for each treatment. A known volume (less than 1 ml to avoid sample dilutions) of the suspension of nauplii to obtain approximately 200 individuals per test was transferred to each test recipient with an automatic pipette. During the transfer of the nauplii, five or more aliquots of the suspension were placed in plastic vials, immediately stained with Rose Bengal and fixed with 4% formalin to estimate the initial number of nauplii.

Test duration, incubation temperature and type/concentration of food were investigated. The test was a static assay with a 12-h light/dark photoperiod. At the end of the test, all recipients were examined under a stereomicroscope to observe the activity of the organisms and the presence of faecal pellets. The total contents of each recipient were poured into plastic vials for staining and fixation. Counts were performed under a stereomicroscope.

### 3.3.4 Toxicity test conditions with *T. biminiensis* nauplii

The tested durations of the assay were 24, 48 and 72 h at 28 °C. The diatoms *T. weissflogii* and *C. gracilis* were used for the feeding test, based on studies by Pinto et al.

(2001) and Araújo-Castro and Souza-Santos (2005), who report that *T. biminiensis* exhibits better development and reproduction when fed diatoms. Four treatments were tested: *T. weissflogii* or *C. gracilis* at a concentration of  $4,0 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>, with and without the addition of fish ration at 28 °C (two drops of a suspension, 1g of fish ration /100 mL of control seawater, were added). Two incubation temperatures were evaluated (25 and 28 °C) using different concentrations of *C. gracilis* (control:  $7,0 \times 10^4$ ;  $2,5 \times 10^5$ ;  $4,0 \times 10^5$ ;  $5,5 \times 10^5$ ;  $7,0 \times 10^5$  and  $1,5 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>). The endpoint was the percentage of copepodites (development from nauplii into copepodites) relative to the total number of live individuals (nauplii and copepodites stained red) at the end of the test.

### 3.3.5 Determination of zinc sulphate heptahydrate concentration

Chemical determinations of Zn<sup>2+</sup> were performed to confirm the concentrations of zinc sulphate heptahydrate (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) following the method described by Locatelli and Torsi (2001). Six concentrations ranging from 0,1 to 10 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O were used. The solutions were prepared in 1% (v/v) seawater acidified to obtain pH 4,5 and ensure that Zn was in the Zn<sup>2+</sup> form. The analytical procedure was performed using the standard addition method with a Zn<sup>2+</sup> reference solution (SpecSol). Measurements were made using a potentiostat/galvanostat (Metrohm Penslab). The results were expressed as mg L<sup>-1</sup> of Zn<sup>2+</sup> and converted to mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

### 3.3.6 Sensitivity of nauplii to zinc sulphate

For the assessment of the sensitivity of *T. biminiensis* nauplii to zinc sulphate, seven bioassays were performed with five concentrations ranging from 0,5 to 10.0 mg L<sup>-1</sup> prepared in an algal suspension of *C. gracilis* at  $2,5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>. Four replicates of each concentration were performed. The recipients were incubated for 72 h at 28 °C and the assays were ended as described above.

The effective concentration (EC<sub>50</sub>: 50% development inhibition based on final number of copepodites in relation to initial number of nauplii), lethal concentration (LC<sub>50</sub>: concentration resulting in 50% mortality in relation to initial number of nauplii) and No Observed Effect Concentration (NOEC) of ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O on *T. biminiensis* nauplii were calculated. The endpoints were calculated based on the mean number of nauplii inoculated at the onset of the test as the total number of exposed individuals, provided that the coefficient of variation (CV) of the initial mean number was less than 20%. For the purposes of

comparison, these parameters were also estimated considering the control results at the end of the tests (Abbott correction).

### 3.3.7 Statistical analysis

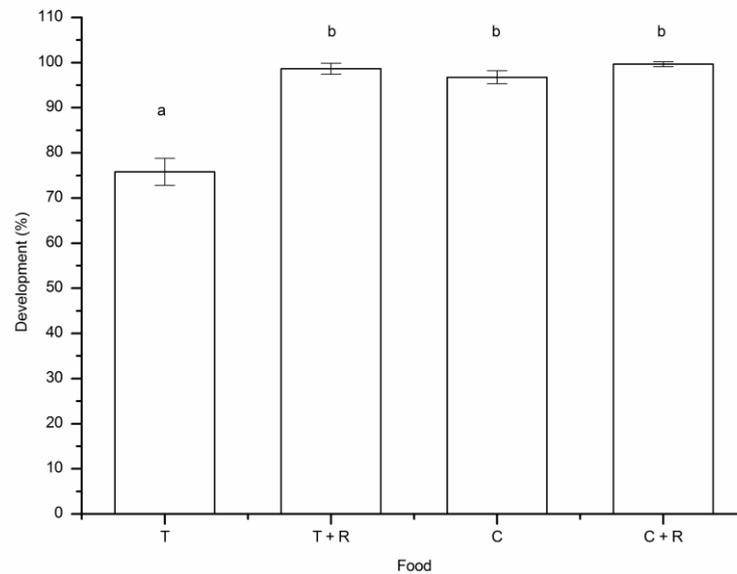
Following the determination of the normality of data distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variances (Bartlett's test), ANOVA was used to compare test conditions. Tukey's test was used to determine pair-wise differences between means. The Trimmed Spearman-Kärber method was used for the calculation of mean ( $\pm$  SD)  $EC_{50}$  and  $LC_{50}$  of the reference substance (HAMILTON et al., 1977). The NOEC was calculated using Dunnett's test. The paired t-test was used to compare the nominal and real concentrations of the reference substance, the mean number of nauplii inoculated and the final number of organisms in the control and both the estimates of  $EC_{50/72h}$  and  $LC_{50/72h}$ . The level of significance was set to 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3.4 Results

### 3.4.1 Conditions of toxicity test with *T. biminiensis* nauplii

The mean ( $\pm$  standard deviation [SD]) percentages of copepodites was  $14,95 \pm 3,90\%$ ,  $72,41 \pm 2,72\%$  and  $98,7 \pm 1,10\%$  after 24, 48 and 72 h at 28 °C, respectively. The best test duration was considered 72 h.

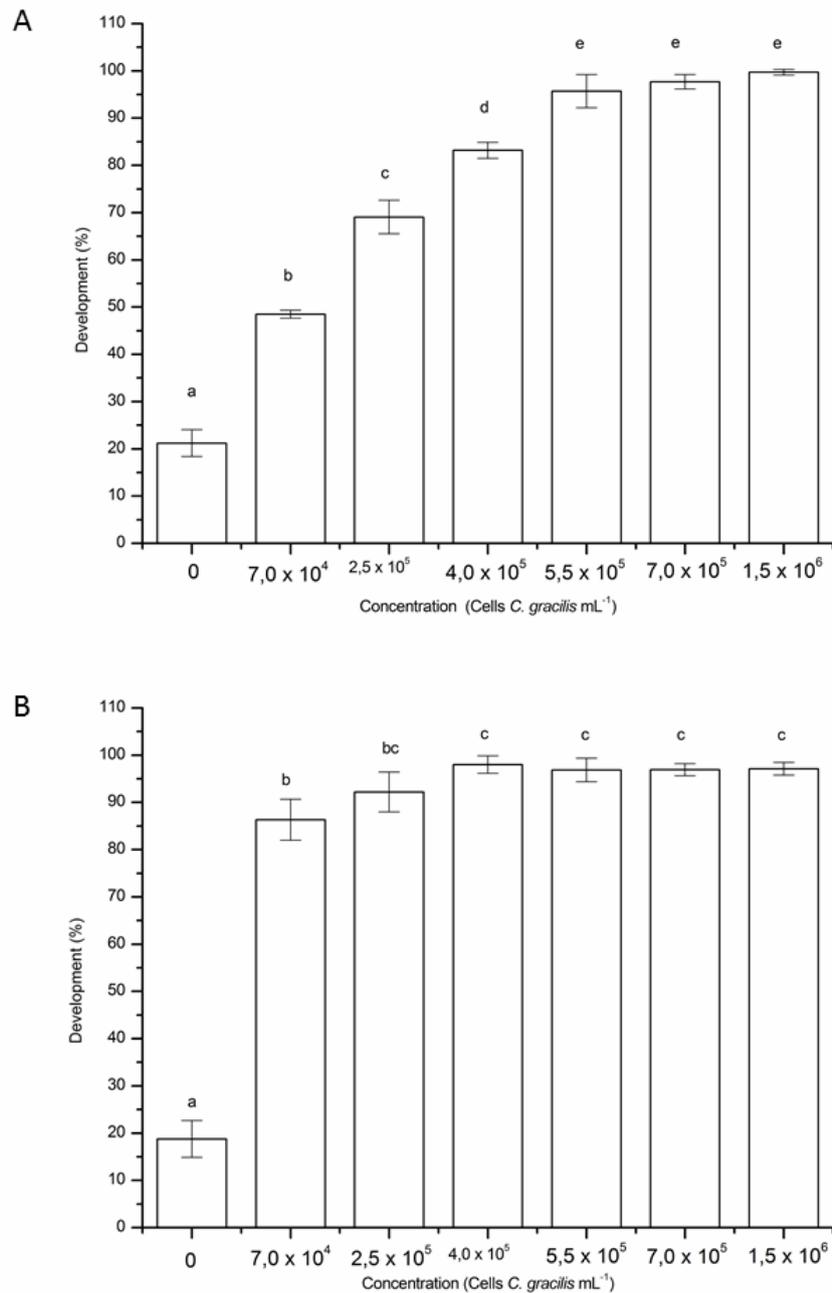
The percentage of copepodites in the feeding test using the diatoms *C. gracilis* and *T. weissflogii* with and without the addition of fish ration varied significantly between treatments ( $F= 201,42$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (Figure 3.2). A significant decrease in the percentage of copepodites occurred when the microalga *T. weissflogii* was used alone. A significant increase in the percentage of copepodites occurred with *C. gracilis* (with and without the addition of fish ration) and *T. weissflogii* with fish ration. No statistically significant differences were found among these last three treatments. Thus, *C. gracilis* without the addition of fish ration was chosen as the best feed.



**Figure 3.2** – Percentage of copepodites of *Tisbe biminiensis* (development from nauplii into copepodites) in different treatments with feeding with *Thalassiosira weissflogii* (T) or *Chaetocerus gracilis* (C) with and without fish ration (T+R, C+R) at 28 °C after 72 h; Different letters denote statistically significant difference ( $p < 0,05$ , Tukey's test).

In the feeding tests with *C. gracilis* performed at 25 °C, no statistically significant differences were found among concentrations greater than  $5,5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , whereas all concentrations below this value differed significantly from each other ( $F = 557,72$ ;  $p < 0,0001$ ). The percentage of copepodites was greater than 90% at concentration of  $5.5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  onwards (Figure 3.3A). At 28 °C, all concentrations of *C. gracilis* achieved significantly higher rates of development in comparison to the control (seawater without the addition of food) ( $F = 292,35$ ;  $p \leq 0,0001$ ). In the absence of food, the percentage of copepodites was 18.8%, whereas this parameter exceeding 80% was found when food was added (all concentrations). No statistically significant differences were found among concentrations greater than  $2,5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  (Figure 3.3B). Thus, a greater percentage of copepodites with lower concentrations of feed was accomplished at 28 °C.

Based on these results, the test conditions established for ecotoxicological assays using nauplii of the copepod *T. biminiensis* were  $2,5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *C. gracilis* at a temperature of 28 °C and duration of 72 h.



**Figure 3.3** – Percentage of copepodites of *Tisbe biminiensis* with different concentrations of *Chaetocerus gracilis* (cells mL<sup>-1</sup>) at 25 °C (A) and 28 °C (B) after 72 h; Different letters denote statistically significant difference ( $p < 0,05$ , Tukey's test).

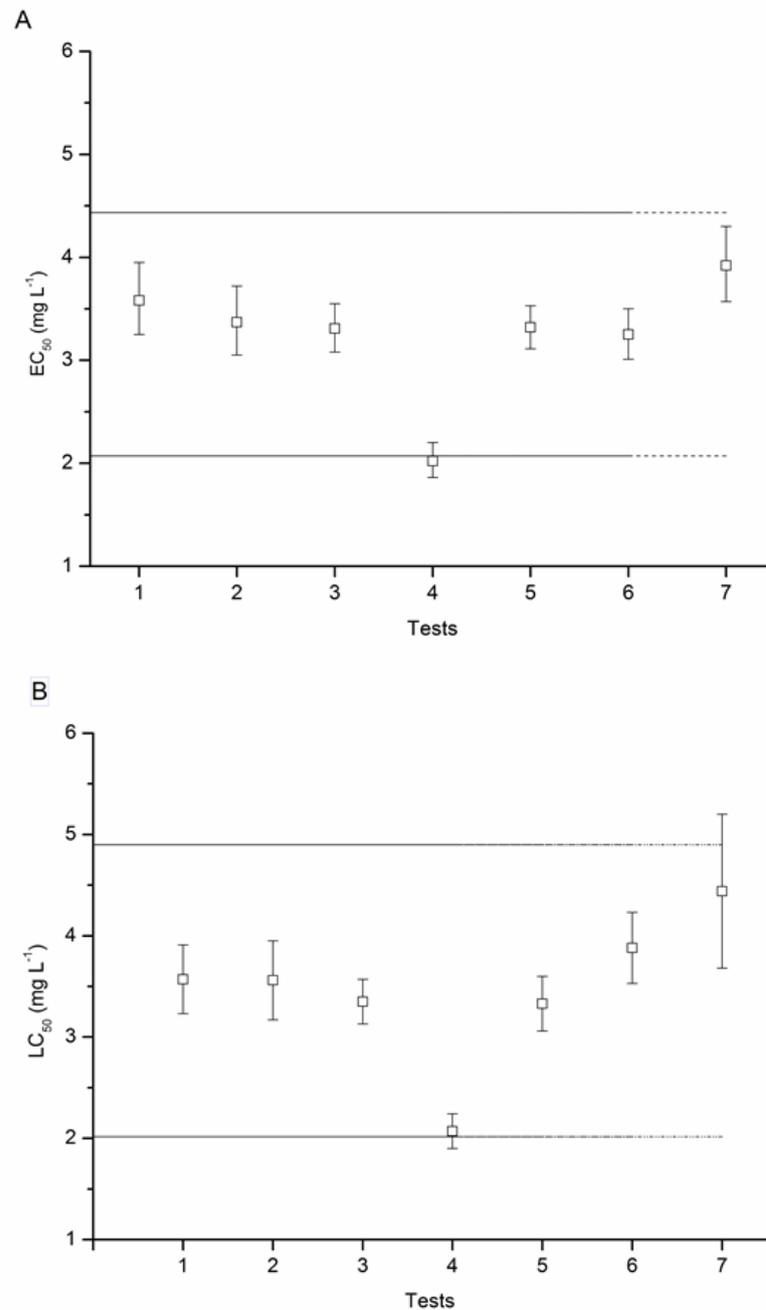
#### 3.4.2 Determination of zinc sulphate concentration

The analytical determination of the concentration of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O solutions used in the sensitivity tests corresponded to a mean of 93,56% of the nominal concentrations. The paired t-test revealed no statistically significant difference between analysed and nominal values ( $p =$

0,2043;  $t = 1,4592$ ), suggesting that the nominal concentrations are in agreement with the real values of the substance employed in the reference tests.

### 3.4.3 Sensitivity of nauplii to zinc sulphate

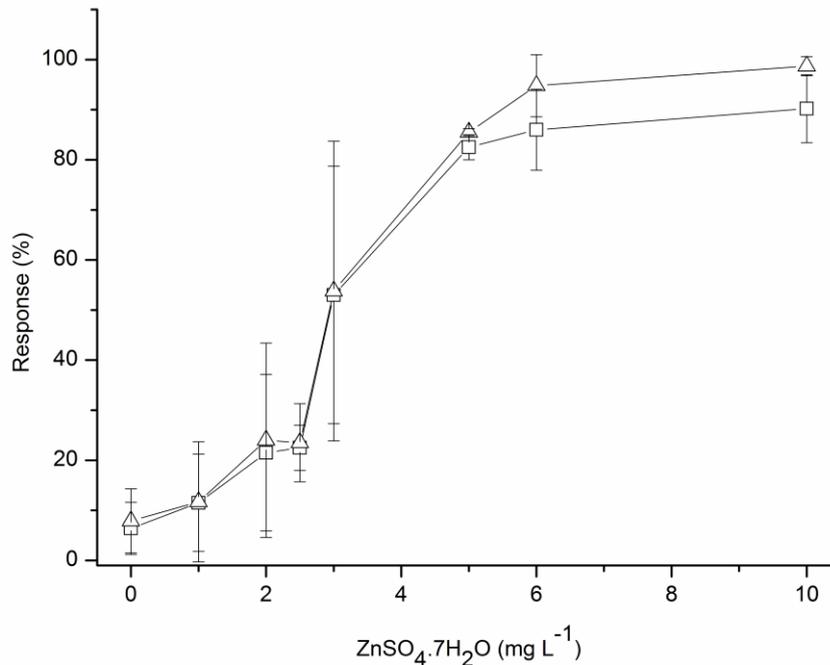
Considering the mean number of nauplii inoculated,  $EC_{50-72h}$  was  $3,25 \pm 0,59 \text{ mg L}^{-1}$  and  $LC_{50-72h}$  was  $3,46 \pm 0,72 \text{ mg L}^{-1}$ . The CV for the number of nauplii inoculated (variation in sampling) was less than 15% in all tests. Considering the percentage of development inhibition in relation to the control,  $EC_{50-72h}$  was  $3,32 \pm 0,64 \text{ mg L}^{-1}$  and  $LC_{50-72h}$  was  $3,53 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$ . The paired t-test revealed no significant differences in these  $EC_{50-72h}$  values ( $t = -1,1798$ ;  $p = 0,2827$ ) or  $LC_{50-72h}$  values ( $t = -0,7557$ ;  $p = 0,4782$ ). Moreover, no significant differences were found between the mean number of nauplii inoculated at the onset of the test and the mean number of organisms in the control at the end of the test ( $t = 1,6409$ ;  $p = 0,1518$ ). The control charts of the sensitivity tests revealed that the majority of results were within the limit of  $\pm 2 \text{ SD}$  (Figure 3.4). The CV was 19,62% for  $EC_{50-72h}$  and 22,92% for  $LC_{50-72h}$ . Thus, the results met the acceptance criterion ( $CV < 30\%$ ) for ecotoxicological assays with reference substances (EC, 1990).



**Figure 3.4** – Control chart with  $EC_{50}$  and  $LC_{50}$  values for *T. biminiensis* nauplii after exposure to different concentrations of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; Dotted lines indicate limits referring to  $\pm 2$  SD in function of mean line.

A concentration-dependent curve was constructed from the results of the percentage of development inhibition from initial nauplii into final copepodites and mortality percentage in function of the concentrations of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , which evidenced a similar response pattern (Figure 3.5). From the ANOVA results considering the effect of development inhibition ( $F =$

46,39;  $p \leq 0,0001$ ) and mortality ( $F = 38,96$ ;  $p \leq 0,0001$ ), the calculated NOEC was  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The respective NOEC,  $\text{EC}_{50-72\text{h}}$  and  $\text{LC}_{50-72\text{h}}$  for 2,0; 3,3 and 3,5  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  were converted into zinc ion values, yielding NOEC,  $\text{EC}_{50-72\text{h}}$  and  $\text{LC}_{50-72\text{h}}$  values of 0,45; 0,75 and 0,79  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{Zn}^{2+}$ , respectively.



**Figure 3.5** – Concentration-dependent curve (mean  $\pm$  SD) in function of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Percentage of development inhibition from *Tisbe biminiensis* nauplii into copepodites ( $\Delta$ ) and mortality ( $\square$ ).

### 3.5 Discussion

The mean percentage of copepodites was greater than 90% after 72 h under the conditions used in the present study, which is a longer naupliar stage than that reported by Pinto et al. (2001), who report 49,2 to 62,6 h, depending on the feeding regimen. This divergence may be associated with the slight difference in temperature between the two experiments (28 °C in the present investigation and 29 °C in the study cited). In assays involving the same species of copepod, Araújo-Castro et al. (2006) reported the percentage of development from nauplii into copepodites of 71,7% after 72 h at 25 °C, suggesting an important effect of temperature on development. According to Williams and Jones (1994), temperature exerts the greatest influence on the development of copepods, followed by food availability. In a later study, Williams and Jones (1999) report the both temperature and food availability significantly affect reproductive aspects of these organisms.

The different results obtained with the different diatoms used in the feeding tests may be related to the smaller cell size of *C. gracilis* (5,33 x 3,15 µm) in comparison to *T. weissflogii* (10,88 x 7,2 µm) (OHSE et al., 2008), allowing the former microalga to be more easily ingested by the nauplii. Dahl et al. (2009) studied the effect of different diatom species as food sources for the copepod *Nitokra spinipis* and obtained different results regarding development, reproduction and survival. The authors state that some species of diatoms offer better quality as food. The satisfactory results achieved with the addition of fish ration, which improved the performance of *T. weissflogii*, is likely linked to the greater food availability. The choice of *C. gracilis* alone as the feed was based on its satisfactory performance and the fact that leftovers in the treatments with the addition of fish ration hindered visualisation during the counts of the organisms.

The present study demonstrated the need for food to ensure the satisfactory development of nauplii into copepodites. However, in studies involving the copepod *T. holothuriae*, Verriopoulos and Moraitou-Apostolopoulou (1989) found that the presence of food in the tests may have reduced the toxicity of zinc, which varies in function of its complexation with organic matter. Brown et al. (2005) also report a reduction in zinc toxicity in the copepod *Bryocamptus zschokkei* in the presence of food (biofilm discs). However, it should be stressed that the introduction of food in toxicity tests represents the actual effects of contaminants on organisms in the environment (SAIZ et al., 2009).

The present tests involved the analysis of the lethal and sublethal effects of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  on *T. biminiensis* nauplii. Studies in the literature have assessed chronic and acute toxicity in the same assay (ARAÚJO-CASTRO et al., 2006; CAMARGO-SOUZA et al., 2007). The  $EC_{50-72h}$  and  $LC_{50-72h}$  values were very similar, which is also evident by the similar response pattern for the two variables in function of the different concentrations of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (Figure 4.5). At concentrations close to or greater than the  $EC_{50-72h}$  and  $LC_{50-72h}$ , the majority of nauplii either died or underwent metamorphosis into copepodites. The development from surviving nauplii into copepodites has also been described by Sunda et al. (1987) in studies addressing the effect of zinc on the survival rate of nauplii of the copepod *Acartia tonsa*. Likewise, Brown et al. (2005) found that zinc caused the death of newly hatched nauplii of the copepod *Bryocamptus zschokkei* at the highest concentrations tested, but the survivors managed to develop and reproduce. The same authors also report that the presence of zinc increases larval development time and diminishes reproductive effort, leading to a reduction in population density.

Table 3.1 lists studies carried out for the assessment of acute zinc toxicity in copepods. Hack et al. (2008) found that larvae of *Robertsonia propinqua* were more sensitive than adults. Brown et al. (2005) report the same for *Bryocamptus zschokkei*. The LC<sub>50</sub> for *T. biminiensis* nauplii after 72 h was twofold greater than that found for *R. propinqua* and 1,2-fold lesser than that found for *B. zschokkei*. It should be stressed, however, that the exposure time in the studies cited was 96 h, suggesting that a longer exposure time may be related to greater sensibility of *R. propinqua* nauplii. Based on the findings, the sensitivity of *T. biminiensis* nauplii to Zn<sup>2+</sup> is similar to that of nauplii of other species of copepod.

**Table 3.1-** EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values in function of Zn (mg L<sup>-1</sup>) for different organisms in toxicity tests.

<i>Test organism</i>	<i>Life stage</i>	<i>T(h)</i>	<i>LC<sub>50</sub></i>	<i>EC<sub>50</sub></i>	<i>Reference</i>
<i>Copepoda</i>					
<i>Acartia lilljeborgi</i>	Adult	48	0.89		Nipper et al. (1993)
<i>Acartia tonsa</i>	Adult	48	0.86		Ihara et al. (2010)
	Adult	48	0.89		Rossato et al. (2009)
<i>Bryocamptus zschokkei</i>	Larvae	96	0.92		Brown et al. (2005)
	Juvenile	96	0.62		
	Adult	96	2.07		
<i>Quinquelaophonte</i> sp	Adult	96	0.64		Stringer et al. (2012)
<i>Robertsonia propinqua</i>	Larvae	96	0.39		Hack et al. (2008)
	Adult	96	0.61		
	Adult	96	2.0		
<i>Tigriopus brevicornis</i>	Adult	96	0.71		Stringer et al. (2012)
<i>Tisbe holothuriae</i>	Adult	48	1.15		Barka (2001)
	Female	48	0.71		Verriopoulos and Moraitou-Apostolopoulou (1989)
<i>Tisbe biminiensis</i>	Larvae	72	0.79	0.75	Present study
<i>Other groups</i>					
<i>Arbacia lixula</i> (Echinodermata)	Embryo-larvae	24		0.048	Prósperi et al. (1994)
		24		0.04	Resgalla Jr and Laitano (2002)
<i>Lytechinus variegatus</i> (Echinodermata)	Embryo-larvae	24		0.048	Rossato et al. (2009)
<i>Megabalanus coccopoma</i> (Cirripedia)	Larvae	36	0.27		Camargo-Souza et al. (2007)
		24		0.24	

T: Test duration in hours.

A number of studies have addressed the toxicity of zinc in organisms from different taxonomic groups. Camargo-Souza et al. (2007) found similar sublethal and lethal concentrations for larvae of the barnacle *Megabalanus coccopoma*. The sea urchins *Lytechinus variegatus* (ROSSATO et al., 2009) and *Arbacia lixula* (PRÓSPERI et al., 1994) and the mussel *Perna perna* (JORGE and MOREIRA, 2005) are more sensitive to zinc than

copepods. According to Resgalla Jr. and Laitano (2002), microcrustaceans (copepods and mysids) are the most sensitive test organism in studies with different reference substances. The same authors state that sea urchins and shellfish are highly sensitive, but exhibit a high degree of specificity to the type of contaminant, which leads to greater variation in the responses.

Zinc is able to inhibit the activity of chitinase and compromise moulting and maintenance processes, thereby influencing the structural integrity of the exoskeleton of crustaceans (POYNTON et al., 2007). This metal inhibits calcium absorption pathways in the epithelia of crustaceans through competition for the same ion channel (SANTORE et al., 2002) and is stored in the carapace in the early life of copepods (FORGET et al., 1998). The greater sensitivity of nauplii may be related to the lesser thickness of the exoskeleton in comparison to that of adults as well as the larger surface, leading to the greater absorption of contaminants (FORGET et al., 1998; MILLER and HARLEY, 1996).

Despite the toxic effects of zinc on copepods, these organisms have regulation mechanisms that assist in the internal balance by sequestering metals (Hook and Fisher, 2002). Thus, as occurs with other aquatic organisms, proteins denominated metallothioneins act on the homeostasis of micronutrients, eliminating excess metals through chelation or complexation and detoxifying them (BIANCHINI et al., 2003). The concentration of metallothioneins varies from species to species (BARKA et al., 2001) and both environmental and physiological factors may affect the production of these proteins (AMIARD et al., 2006). Moreover, the methodological aspects of each test employed can lead to changes in the sensitivity of organisms.

### **3.5 Conclusion**

The copepod *T. biminiensis* has an established, low-cost cultivation method that is easy to maintain, resulting in the simple, continuous acquisition of organisms. The protocol developed herein for *T. biminiensis* nauplii resulted in a practical, easy, low-cost, short-term test with both lethal and sublethal endpoints exhibiting an acceptable degree of variation. *T. biminiensis* nauplii are as sensitive to zinc as the nauplii of other species of copepods employed in ecotoxicological studies, but are less sensitive than the larvae of sea urchins and shellfish. The findings demonstrate that *T. biminiensis* nauplii are useful for ecotoxicological studies and can be employed in studies assessing the toxicity of samples of marine and estuarine water. Furthermore, the future study of other sublethal endpoints may increase the sensitivity of this short-term test.

## 4 CAPÍTULO II

---

O teste com náuplios de *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida) na avaliação da toxicidade da água do complexo estuarino de Suape, Pernambuco-  
Brasil

#### 4.1 Resumo

Os náuplios de copépodos têm sido utilizados em testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade aos contaminantes quando comparado ao estágio adulto. Estudos anteriores demonstraram que o ensaio com o estágio naupliar de *Tisbe biminiensis* é rápido e de fácil execução, sendo sua sensibilidade similar a de outros copépodos. O objetivo do presente estudo foi empregar o teste com náuplios do copépodo *T. biminiensis* na avaliação ecotoxicológica de amostras de água marinha e estuarina da região do complexo estuarino de Suape coletadas entre 2011 e 2013. Neste estudo, além dos parâmetros de percentual de mortalidade, percentual de copepoditos e percentual de inibição do desenvolvimento, foram adicionados outros parâmetros com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste: frequência dos estágios dos copepoditos, média do comprimento total e da cabeça por estágio e geral. Os resultados indicaram que o teste com náuplios de *T. biminiensis* pode ser empregado na avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais e que a água na região de Suape apresenta toxicidade sub-letal, mais associada ao mês de Setembro, início do período seco. Dentre os parâmetros avaliados, a inibição do desenvolvimento foi o que mais indicou toxicidade, seguido pelo percentual de copepoditos. Apesar da obtenção das medidas adicionais de comprimento geral e da cabeça por estágio e da frequência de estágios reduzirem a praticidade do método, em um dos pontos de coleta elas aumentaram a sensibilidade na detecção de efeitos tóxicos, indicando a possibilidade de sua incorporação em estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: copépodo, avaliação ecotoxicológica, Suape, água.

## 4.2 Introdução

Os copépodos têm sido utilizados para avaliar efeitos agudos e crônicos dos contaminantes presentes no meio aquático, sendo considerados potenciais indicadores de contaminação ambiental. Estes organismos apresentam várias características que os tornam modelos biológicos apropriados, tais como tamanho diminuto, curto ciclo de vida, ampla distribuição geográfica, importância na cadeia alimentar e fácil cultivo em laboratório (BROWN et al., 2005). Além destas características, também é indicada a utilização de espécies nativas em estudos ecotoxicológicos com amostras ambientais, uma vez que elas expressam a situação de campo local com maior particularidade e segurança (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

O copépodo harpacticóide marinho *Tisbe biminiensis* Volkmann - Rocco (1973) tem sido utilizado e recomendado em testes de toxicidade no Brasil na avaliação de amostras de sedimento (ARAÚJO-CASTRO et al. 2006; ARAÚJO-CASTRO, 2008; COSTA, 2009; TORREIRO, 2010; ARAÚJO-CASTRO et al. 2013a; ARAÚJO-CASTRO et al. 2013b;) e de água marinha e estuarina (OLIVEIRA, 2011; LAVORANTE et al., 2013).

Assim como ocorre em outras espécies de copépodos, a sensibilidade do estágio naupliar de *T. biminiensis* é maior que a do adulto, considerando o dicromato de potássio como substância de referência (ARAÚJO-CASTRO et al., 2006). Lavorante et al. (2013) observaram que a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* ao sulfato de zinco é semelhante a de larvas de outras espécies de copépodos.

A maior sensibilidade dos copépodos nos estágios larvais que nos estágio adulto vem sendo observada em várias espécies. Brown et al. (2005) verificaram que as larvas do copépodo harpacticóide de água doce *Bryocamptus zschokkei* são mais sensíveis ao zinco que os adultos. Os náuplios do copépodo calanóide marinho *Pseudodiaptomus marinus* também apresentaram maior sensibilidade ao óxido de tributilestano que os estágios mais avançados de desenvolvimento (HUANG et al., 2006). Estudando a sensibilidade da espécie harpacticóide estuarina *Robertsonia propinqua* ao metal zinco, Hack et al. (2008) observaram o mesmo evento. Saiz et al. (2009) relataram que os náuplios do copépodo ciclopóida *Oithona davisae* também foram mais sensíveis que o estágio adulto para o contaminante naftaleno.

Diante destas informações, Lavorante et al. (2013) estabeleceram um novo protocolo para avaliação da toxicidade de amostras de água marinha e estuarina usando náuplios de *T. biminiensis* tornando o método mais prático e rápido. Neste trabalho, os náuplios em suspensão foram transferidos aos recipientes-teste por amostragem. Segundo os autores, o estudo surgiu da necessidade do desenvolvimento de novos testes de toxicidade aquática em

substituição ao teste embriolarval com o ouriço-do-mar *Lythechinus variegatus*, cuja população encontra-se em declínio em algumas áreas do Brasil, principalmente na região Nordeste (IHARA et al. 2010). Os autores observaram que a sensibilidade dos náuplios é comparável a de outros copépodos considerando a mesma substância de referência, que a variação do teste permaneceu dentro dos limites aceitáveis e que se faz necessária a utilização do teste em estudos toxicológicos envolvendo amostras de águas marinhas e de estuários.

As regiões costeiras, localizadas na interface entre sistemas aquáticos e terrestres, apresentam enorme importância aos interesses humanos, pois constituem uma fonte significativa de recursos alimentares de diversas categorias, de matéria prima para vários setores de produção, incluindo a indústria farmacêutica, além de propiciarem áreas para habitação, recreação e transporte (CASTRO e HUBER, 2003). A pressão constante exercida sobre este ambiente pode comprometer o seu funcionamento e causar desequilíbrio ecológico e riscos a saúde humana (DIAZ e ROSENBERG, 2008; SALE et al., 2008).

Dentre as atividades geradoras de desenvolvimento econômico, as regiões portuárias são potencialmente geradoras de diversas fontes de poluição que podem causar danos aos ambientes costeiros. Estas áreas constituem campos de conflito quanto à disposição desordenada dos resíduos no ambiente e ao uso do espaço e dos recursos naturais, podendo gerar riscos ambientais variados devidos a carga, descarga, transporte e armazenamento de diversos produtos (MOORE et al., 2004). A modernização do modelo portuário ao longo das últimas décadas fez com que estas regiões se tornassem grandes centros de comércio e indústrias, adequando sua estrutura física e consumindo grandes espaços de terra e água (RIAL, 2008).

O Complexo Industrial Portuário Governador Eraldo Gueiros- SUAPE está situado no complexo estuarino de Suape, litoral Sul do Estado de Pernambuco-Brasil. Sua operação teve início em abril de 1984 e vem trazendo várias modificações nas condições geomorfológicas e hidrológicas da região durante os últimos anos (NEUMANN et al., 1998; MUNIZ et al., 2005). SUAPE conta com mais de 100 empresas em operação e 50 em processo de implantação, dentre elas, importantes empreendimentos como estaleiros, refinaria, um pólo têxtil e um petroquímico (PERNAMBUCO, 2014). Empresas de beneficiamento e envasamento de óleos vegetais, bebidas, metal-mecânico, embalagens PET, beneficiamento de minérios, cosméticos, de transporte, armazenamento e distribuição de derivados de petróleo e biocombustíveis e do setor cerâmico também são integrantes deste grande complexo industrial.

As diversas intervenções antrópicas resultantes das atividades de SUAPE vêm causando danos para a biota da região (KOENING et al., 2003; SILVA et al., 2004, FARRAPEIRA et al., 2009; BEZERRA-JUNIOR et al, 2011). Com o crescimento contínuo deste empreendimento são necessários estudos ambientais que ajudem a proteger as comunidades bióticas e as áreas de importância ecológica que se encontram próximas ao complexo e que poderão ser significativamente afetadas em um futuro próximo. Além disto, estes dados podem servir de referência para o acompanhamento das modificações que podem vir a ocorrer neste complexo estuarino ao decorrer da sua operação.

O uso de testes de toxicidade possibilita avaliar o risco ecotoxicológico para as comunidades aquáticas (VIGANO et al., 2001). Alguns estudos ecotoxicológicos realizados por empresas privadas de SUAPE verificaram toxicidade em amostras de água superficial coletadas na Baía de Suape e nos rios Massangana e Tatuoca, sobretudo para a fotobactéria *Vibrio fisheri* (MULTICONSULTORIA, 2004; MENDONÇA, 2005; PIRES ADVOGADOS e CONSULTORES, 2005).

Além destes estudos, apenas três trabalhos de pesquisa ecotoxicológica foram realizados com amostras de água da região. Estudando amostras coletadas em 2007, Souza-Santos e Araújo (2013) utilizaram o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* como organismo-teste e os resultados indicaram que a área apresentou toxicidade crônica variável.

Oliveira (2011) propôs a utilização dos náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis* como alternativa ao teste com a espécie *L. variegatus*, cuja população encontra-se em declínio ao longo da costa litorânea brasileira. A autora realizou um estudo ecotoxicológico comparativo utilizando amostras coletadas entre 2009 e 2010, no qual foi possível observar que a sensibilidade dos náuplios foi semelhante à das larvas de ouriço. No entanto, o teste proposto foi considerado laborioso, devido à transferência individual dos náuplios para placas multi-poços, o que demandou muito tempo para sua execução. Araújo e Souza-Santos (2013) utilizaram a microalga *Thalassiosira weissflogii* em comparação ao ouriço do mar em amostras coletadas entre 2010 e 2011 e relataram que a região apresentava toxicidade crônica, variável com o mês da coleta, ressaltando a necessidade de mais pesquisas na área.

Perante os poucos dados de toxicidade da água da região, há a necessidade de uma avaliação dos aspectos ecotoxicológicos que podem fornecer informações acerca das condições ambientais para que possíveis medidas de fiscalização e controle sejam implementadas.

Diante do exposto, o presente estudo visa utilizar o protocolo com náuplios do copépodo *T. biminiensis* desenvolvido por Lavorante et al (2013) na avaliação da toxicidade

de amostras de água superficial coletadas na região estuarina de Suape que apresenta grande importância ecológica e econômica para o Estado de Pernambuco. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste, foram avaliados novos parâmetros ecotoxicológicos em adição aos parâmetros de percentual de mortalidade, inibição e desenvolvimento dos náuplios estabelecidos no protocolo original: crescimento dos copepoditos, geral e por estágio, e a frequência de estágios dos copepoditos ao final do ensaio.

### **4.3 Material e Métodos**

#### *4.3.1 Área de estudo*

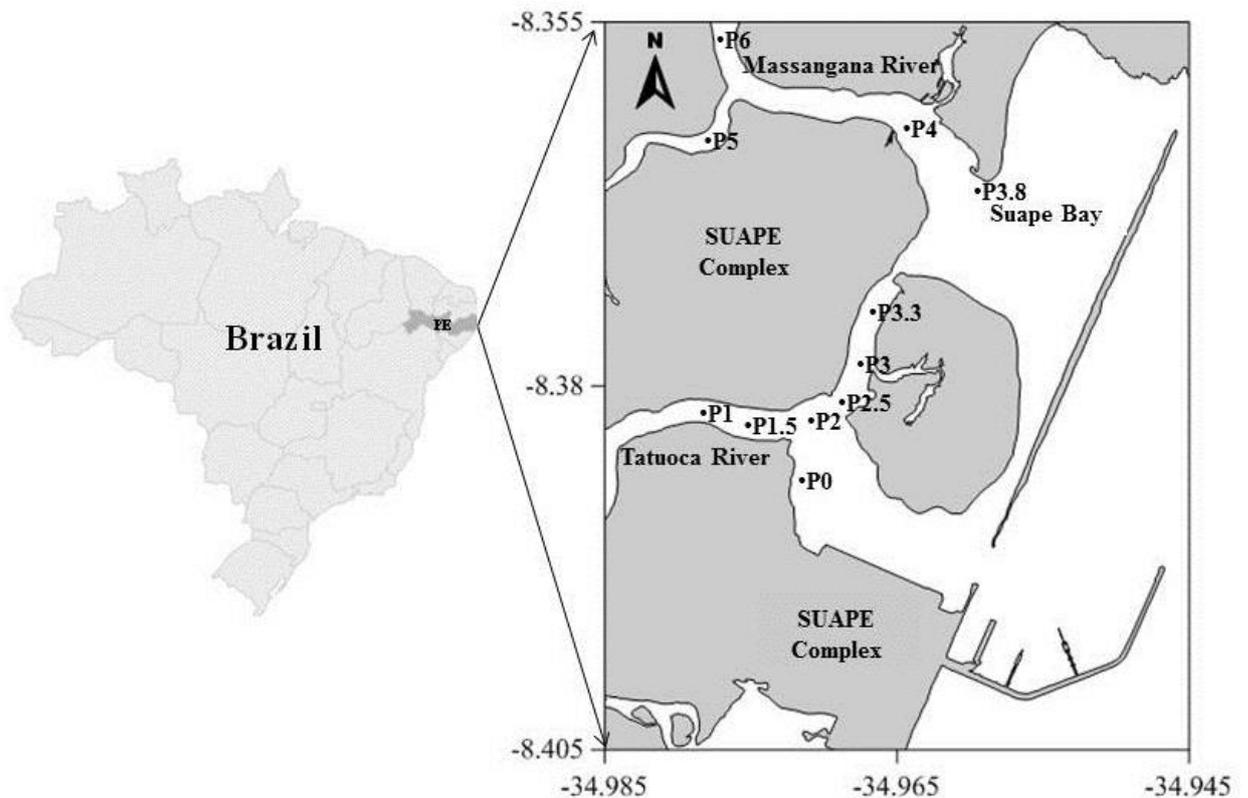
O complexo estuarino de Suape está localizado entre os municípios de Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca, no estado de Pernambuco-Brasil (08°23'30.56" S e 34°57'38.00" W). A região tem clima tropical úmido do tipo As', segundo Köppen, com períodos chuvosos de inverno. As maiores precipitações são observadas nos meses de maio, junho e julho, enquanto os meses de outubro, novembro e dezembro são os mais secos. A temperatura média anual da região é de 24 °C, variando entre 18°C e 32°C (CPRH, 1999; CPRM, 2005).

A instalação do Complexo Industrial Portuário Governador Eraldo Gueiros - SUAPE na região provocou várias alterações fisiográficas, dentre elas, o aterramento do trecho que comunicava os rios Merepe e Ipojuca com o sistema estuarino formado pela Bacia de Suape e pelos rios Tatuoca e Massangana (KOENING et al., 2002). Alterações hidrológicas também foram observadas, pois foram verificadas altas salinidades nas áreas mais internas (NEUMANN-LEITÃO, 1994).

O rio Massangana serve de limite entre os municípios de Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca, tendo como formadores os rios Tabatinga e Utinga de Baixo, ambos com nascentes no município de Ipojuca, desaguando ao sul do promontório de Santo Agostinho, onde encontra o rio Tatuoca (CPRH, 1999). Este rio também recebe águas dos riachos Algoduais e da Ilha das Canas. O rio Tatuoca nasce a 6 km da foz, constituindo, em quase toda a sua extensão, parte de uma complexa rede de canais e estuário afogados (CPRH, 2003; PESSOA, 2009). Origina-se a partir de descargas superficiais, que, misturadas às águas marinhas, forma um manguezal (FADE, 2006). Segundo o estudo realizado por Pessoa (2009), além das variações comuns a um sistema instável, os estuários dos rios Massangana e Tatuoca encontram-se fortemente influenciados pela carga de efluentes industriais e impactos relacionados à dragagem que ocorre na região.

#### 4.3.2 Coleta e acondicionamento das amostras

As coletas das amostras foram realizadas em setembro de 2011, março e junho de 2012 e janeiro, abril e setembro de 2013 em pontos localizados no estuário de Suape (Figura 4.1 e Tabela 4.1). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 foram coletados nas campanhas de setembro de 2011 e março e junho de 2012. Por questões operacionais e logísticas, entre as campanhas de janeiro, abril e setembro de 2013, houve uma mudança nos pontos de coleta, sendo coletados os pontos P1.5, P2.5, P3.3, P3.8 a P0. As amostras de água superficial foram coletadas durante a maré-baixa, em garrafas plásticas de 500 mL, acondicionadas em caixas térmicas com gelo para transporte até ao laboratório. As amostras foram mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes, por um período máximo de 60 dias de acordo com as orientações da CETESB (2011) e da NBR 15469 (ABNT, 2007). A salinidade, a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido das amostras foram aferidos *in locu* com refratômetro, termômetro digital, pHmetro e oxímetro, respectivamente.



**Figura 4.1** – Distribuição dos pontos de coleta no complexo estuarino de Suape. Modificado de Araújo e Souza-Santos (2013).

**Tabela 4.1-** Coordenadas geográficas dos pontos coletados em Suape.

<i>Pontos</i>	<i>Coordenadas</i>		<i>Localização</i>
P1	08°22'895" S	034°58'798" W	Perto do enrocamento do Rio Tatuoca
P2	08°23'2.3" S	034°58'19.3" W	Defronte ao Estaleiro Atlântico Sul (EAS)
P3	08°22'47.7" S	034°58'5.3" W	Entre o EAS e a Ilha dos Cocais
P4	08°21'36.2" S	034°57'49.5" W	Rio Massangana
P5	08°21'47.2" S	034°58'40" W	Rio Massangana
P6	08°21'14.2" S	034°58'35.9" W	Rio Massangana
P0	08°23'277" S	034°58'275" W	Influência de indústria petroquímica
P1.5	08°22'895" S	034°58'798" W	Entre o enrocamento e o EAS
P2.5	08°22'55.3" S	034°58'14.1" W	Próximo ao EAS
P3.3	08°22'14.2" S	034°58'08" W	Em frente ao estaleiro PROMAR
P3.8	08°21'40" S	034°57'47,1" W	Massangana

#### 4.3.3 Obtenção e cultivo dos copépodos e das microalgas

Os copépodos da espécie *T. biminiensis* foram obtidos de amostras de sedimento e macroalgas coletadas em janeiro de 2010 na praia do Farol na cidade de Olinda, Pernambuco-Brasil. Fêmeas ovadas foram retiradas das amostras e cultivadas em laboratório até obtenção da prole. Após confirmação da espécie das fêmeas (Volkman-Rocco, 1973), as proles foram unidas e o cultivo em massa dos copépodos conduzido segundo Ribeiro e Souza-Santos (2011). Os organismos foram mantidos em recipientes plásticos contendo água do mar com salinidade  $34 \pm 2$ , temperatura ambiente de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo natural de aproximadamente 13h luz/11h escuro, sob aeração constante. A água do mar foi previamente filtrada (filtros de 25 e 5  $\mu\text{m}$ ), clorada com hipoclorito de sódio e declorada com tiosulfato de sódio. A alimentação foi realizada com ração básica para peixes ornamentais (Alcon<sup>®</sup>) e com a diatomácea *Chaetocerus gracilis* cultivada em meio f/2 de Guillard (1975) a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h claro /12h escuro.

#### 4.3.4 Obtenção de náuplios para o teste

Os náuplios utilizados nos ensaios ecotoxicológicos foram obtidos a partir de fêmeas ovadas mantidas em um sistema de duas caixas plásticas sobrepostas, onde o fundo da caixa superior apresentava uma malha de 120  $\mu\text{m}$  para contenção das fêmeas, possibilitando a passagem dos náuplios através da malha para a caixa inferior (LAVORANTE et al., 2013). Após 20-24 horas, os náuplios recém-eclodidos foram concentrados para obtenção de uma suspensão cuja densidade foi estimada em câmara de Sedgwick-Rafter com auxílio de

microscópio a partir da retirada de três alíquotas de 0,5 mL. A partir destes resultados, foi estimado o volume da suspensão a ser transferido para cada recipiente-teste.

#### 4.3.5 Descrição do teste

O teste de toxicidade seguiu as condições definidas por Lavorante et al. (2013) e encontram-se sumariamente apresentadas na tabela 4.2. A água do mar oceânica controle utilizada nos testes ecotoxicológicos foi coletada a 30 km da linha de costa do Porto da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil (08°11'158" S e 34°42'486"W). Em laboratório, a água controle foi filtrada com membrana 0,45 µm e mantida ao abrigo da luz. Na semana de cada teste, a água controle foi autoclavada (120°C/15 min) e a salinidade foi ajustada para 34.

Foram utilizados recipientes-teste de vidro com fundo chato (7 cm de diâmetro x 5 cm de altura) contendo 25 mL da solução-teste, em quadruplicata, para cada amostra e para a água do mar controle. A microalga *C. gracilis* foi adicionada como alimento na concentração de  $2,5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, não havendo nova adição de alimento nem troca de água no decorrer do teste. Um volume conhecido da suspensão de náuplios com idade inferior a 24 h foi transferido com pipetador automático de forma a se obter um número entre 100-200 indivíduos por recipiente-teste. No decorrer da transferência dos indivíduos para os recipientes-teste, foram coletadas cinco alíquotas da suspensão, imediatamente coradas com rosa de bengala e fixadas com formol a 4%, para cálculo da média de náuplios inoculados e do coeficiente de variação da inoculação.

**Tabela 4.2** – Condições do teste ecotoxicológico utilizando náuplios do copépodo *T. biminiensis*.

<i>Resumo das Condições-teste</i>	
Tipo de teste	Estático
Organismo-teste	Náuplios (<24h) de <i>T. biminiensis</i>
Água controle ou de diluição	Água natural marinha filtrada
Volume da solução-teste (mL)	25
Nº de réplicas	4
Nº organismos/recipiente	100-200
pH	8-9
Salinidade (‰)	34 ± 2
Temperatura (°C)	28 ± 1
Fotoperíodo (h:h)	12L:12D
Alimentação <i>C. gracilis</i> (cel mL <sup>-1</sup> )	$2,5 \times 10^5$
Aeração	Não
Tempo de exposição (h)	72
Efeitos observados ao final do teste	Mortalidade, Copepoditos e Inibição do desenvolvimento (%); Frequência dos estágios de copepoditos; Comprimento (µm) total e da cabeça, geral e por estágio.

Após a incubação por 72h a 28°C, o encerramento do teste ocorreu de forma que cada recipiente teve seu conteúdo vertido em potes plásticos e foram lavados com auxílio de pisseta para retirada dos organismos que permaneceram aderidos às paredes. A coloração com rosa de bengala e a fixação com formol 4% ocorreram imediatamente. A contagem do número total de náuplios e copepoditos foi realizada com auxílio de estereoscópio. Com base nestes valores, foram calculados três parâmetros: o percentual de mortalidade (M) ou efeito letal, relacionando a média de náuplios inoculados no início do teste com o número de sobreviventes totais corados ao fim do teste (Eq. 1); o percentual de desenvolvimento para copepoditos (D) de náuplios para copepoditos, efeito sub-letal, considerando a relação entre o número final de copepoditos e o total de sobreviventes (Eq. 2); e o percentual de inibição de desenvolvimento (I), considerando a relação entre o número final de copepoditos e a média de náuplios inoculados no início do teste, atrelando os dois tipos de efeito (Eq. 3). Onde: *NC*= Número de copepoditos; *NT*= Número de sobreviventes totais; *NI*= Número de náuplios inoculados no início do teste.

$$M = \frac{NI - NT}{NI} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$D = \frac{NC}{NT} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$I = \frac{NI - NC}{NI} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

#### 4.3.6 Observação dos estágios de desenvolvimento e crescimento

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do ensaio, foram observados os estágios de desenvolvimento e o crescimento dos copepoditos ao final do teste, em adição aos parâmetros estabelecidos no protocolo original. Volkmann – Rocco (1973) observou que os copépodos de *T. biminiensis* possuem seis estágios naupliares seguidos por cinco estágios de copepoditos ou juvenis antes de atingirem a fase adulta. Pinto et al. (2001) observou que a 29°C e em 3 dietas a duração do estágio naupliar desta espécie de copépodo variou de 49,2 h a 62,6 h, o tempo de desenvolvimento até o estágio adulto foi de 4,25 a 6,59 dias e o ciclo de vida teve duração média de 30 dias. No presente trabalho, os copepoditos foram classificados em primeiro estágio de copepodito (C1), segundo estágio de copepodito (C2), terceiro estágio de copepodito (C3) e últimos estágios de copepoditos ( $\geq$ C4) através da observação do número de patas torácicas e de segmentos abdominais.

Os copépodos adultos de *T. biminiensis* apresentam um comprimento total que varia de 900 a 1600 µm, incluindo os ramos caudais (VOLKMANN-ROCCO, 1973). Neste trabalho, para medição do comprimento total dos copepoditos foi considerada a região do rostrum até a furca tomada numa visão lateral. Esta medida consistiu na soma dos comprimentos do prossoma (cabeça e região torácica) e do urossoma (abdômen), devido à presença de uma leve inclinação na região de articulação entre estas duas regiões após o processo de fixação. A medição da cabeça, região anterior do cefalossoma (do rostrum até o final dos I e II segmentos fundidos), foi realizada numa visão dorsal.

Para obtenção dos dados de estágios de desenvolvimento e crescimento, foram utilizadas as amostras coletadas em abril e setembro de 2013. Aleatoriamente, 30 copepoditos foram retirados de cada réplica, totalizando 120 espécimes para cada ponto e para o controle. Cada indivíduo foi observado sob microscópio e medido com uma escala milimetrada acoplada à lente ocular. Para obtenção do comprimento (µm), foi utilizada uma lâmina padrão de vidro com régua milimetrada (100 mm) e realizada conversão para o aumento utilizado.

#### 4.3.7 Testes com substância de referência

A fim de avaliar a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* foram realizados testes empregando o sulfato de zinco heptahidratado como substância de referência, paralelamente aos ensaios com as amostras ambientais. Foram realizados testes de sensibilidade para todas as amostras coletadas, exceto para as amostras coletadas em Junho de 2012, devido ao número insuficiente de náuplios obtidos. Foram utilizadas quatro concentrações, com quatro réplicas cada, na faixa de 1,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> preparadas em suspensão algal (água do mar controle contendo a microalga *C. gracilis* a uma concentração de 2,5 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>). A incubação e o encerramento ocorreram nas mesmas condições do teste com as amostras. Foram calculadas as CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva) com base no percentual de inibição do desenvolvimento e a CL<sub>50</sub> (Concentração Letal) do ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O para náuplios de *T. biminiensis*. O parâmetro de desenvolvimento de náuplios para copepoditos não foi utilizado, pois nas concentrações mais elevadas da substância de referência era observada alta mortalidade dos náuplios e, ao final do teste, todos os sobreviventes eram copepoditos.

#### 4.3.8 Análise estatística

Para verificar a toxicidade das amostras ambientais, os resultados dos parâmetros obtidos para os diferentes pontos estudados e o controle foram comparados utilizando-se a ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ), depois da verificação da normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov,  $\alpha$

= 0,05) e da homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett,  $\alpha = 0,05$ ). Quando diferenças significativas foram encontradas, o teste de Tukey e de Dunnett foram utilizados *a posteriori*, para indicar diferenças significativas entre os pontos e dos pontos em relação ao controle, respectivamente. Para dados que não apresentaram normalidade ou homocedasticidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Para cálculo da  $CE_{50}$  e a  $CL_{50}$  a partir dos resultados dos testes com a substância de referência foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977). As cartas-controle dos testes de sensibilidade foram construídas, considerando os limites de  $\pm 2$  desvios padrões (DP). A análise de regressão linear simples foi usada entre o comprimento total e da cabeça dos copepoditos obtidos dos controles. As regressões obtidas para os controles foram comparadas por meio de intervalos de confiança de 95%. Para comparação da frequência dos estágios de desenvolvimento dos copepoditos de cada amostra em relação ao controle foi utilizado o teste de G ( $p \leq 0,05$ ), teste de qui-quadrado de Williams (ZAR, 1996).

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Parâmetros físicos e químicos

A pluviometria nos meses de coleta foi similar ao padrão histórico de chuvas da região, onde os meses de Outubro a Dezembro são considerados os mais secos e os de Maio a Julho os mais chuvosos. O mês de Junho de 2012 foi o mês de coleta mais chuvoso e o de Março de 2012 o mais seco (Tabela 4.3).

Os resultados obtidos dos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido e salinidade nas amostras coletadas nos pontos estudados encontram-se na tabela 4.3. O pH permaneceu na faixa de 7.18 a 8.29, o oxigênio dissolvido entre 4.62 e 7.72 mg L<sup>-1</sup> e a salinidade entre 28 e 40. Nos pontos P4, P5 e P6 localizados no rio Massangana e coletados em Setembro de 2011, as concentrações de oxigênio dissolvido se encontraram próximas a 5 mg L<sup>-1</sup>, concentração mínima indicada para organismos aquáticos (CONAMA, 2005), indicando um comprometimento da área porquanto as coletas foram realizadas na maré-baixa sob forte influência das águas do rio. Em relação a salinidade, na coleta realizada em Setembro de 2011, esta variou entre 28 a 36, sendo registrado no ponto P5 o menor valor. No mês de Março de 2012, foi observada salinidade acima de 38 em todos os pontos coletados. Em Junho de 2012, a salinidade variou entre 32 e 36. Nos meses de Janeiro e Abril de 2013, a salinidade variou entre 31 e 35 e de 32 a 39, respectivamente. Por questões logísticas, a coleta de Janeiro de 2013 foi realizada na maré alta. Em Setembro de 2013, a salinidade manteve-se entre 30 e 34.

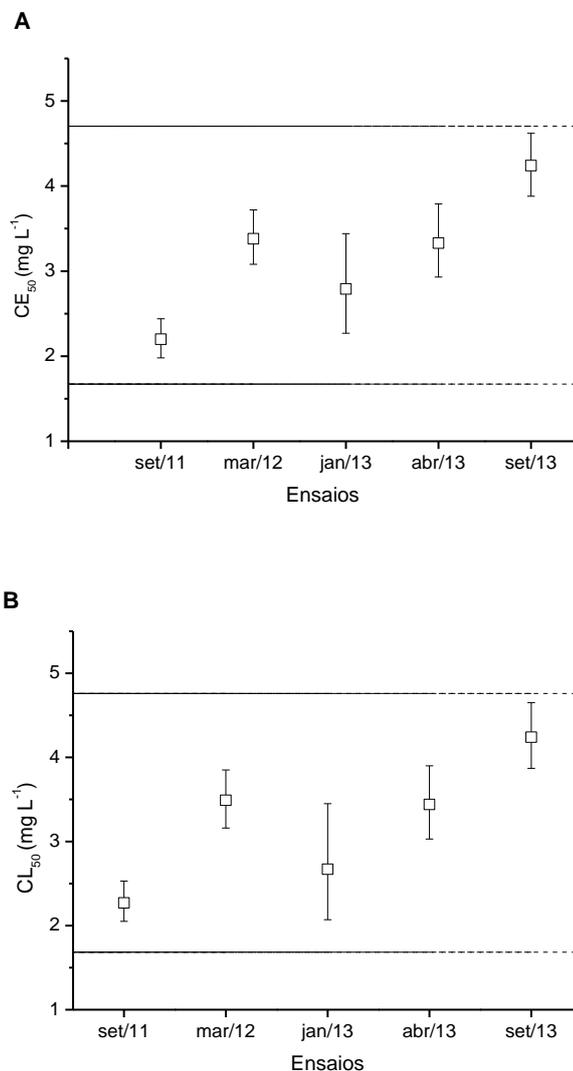
**Tabela 4.3-** Resultados dos parâmetros físicos e químicos da água superficial coletada no complexo estuarino de Suape entre os meses de Setembro de 2011 e Setembro de 2013.

<i>Data da coleta</i>	<i>Pluviometria D/M (mm)</i>	<i>M.A.</i>	<i>M.B.</i>	<i>Ponto</i>	<i>Hora</i>	<i>pH</i>	<i>O.D.</i>	<i>Sal.</i>
01/09/ 2011	0,0/54,8	05:45-2,4m	12:00-0,2m	1	11:14	7,77	7,43	35
				2	11:28	7,88	6,32	36
				3	11:36	7,86	6,02	30
				4	11:56	7,57	5,04	31
				5	12:07	7,46	4,62	28
				6	12:18	7,49	5,30	34
19/03/ 2012	0,0/48,6	02:06-2,0m	08:29-0,5m	1	08:05	8,14	7,10	40
				2	08:13	7,83	6,90	38
				3	08:22	8,00	6,31	38
				4	08:35	8,14	5,64	40
				5	08:42	7,73	6,23	39
				6	08:55	7,87	6,60	40
05/06/ 2012	0,0/317,6	04:11-2,3m	10:28-0,1m	1	09:40	8,29	6,90	36
				2	09:52	8,15	6,42	36
				3	10:07	8,10	6,15	33
				4	10:22	8,00	5,80	35
				5	10:35	7,85	5,68	35
				6	10:42	7,92	6,34	32
15/01/ 2013	0,0/54,4	06:19-2,1m	12:23-0,4m	2.5	08:00	7,80	6,20	31
				3.3	07:40	7,71	5,93	35
				3.8	07:30	8,01	6,32	35
24/04/ 2013	9,6/196,7	02:36- 2,3m	08:43-0,2m	1.5	09:04	7,43	5,20	37
				2.5	08:21	7,73	5,90	39
				3.3	08:10	7,60	5,00	39
				3.8	07:55	7,18	5,23	32
04/09/ 2013	1,8/153,6	03:00- 2,2m	09:11-0,2m	0	09:10	7,72	7,72	34
				1.5	09:50	7,89	7,28	30
				3.8	08:10	8,08	7,10	30

M.B.= Maré Baixa; M.A.= Maré Alta; O.D.= Oxigênio Dissolvido; Sal.= Salinidade. D/M: Diária/Mensal.

#### 4.4.2 Sensibilidade à substância de referência

Considerando os resultados obtidos para os cinco testes realizados, as médias da  $CE_{50-72h}$  e da  $CL_{50-72h}$  foram de  $3,19 \pm 0,76$  e  $3,22 \pm 0,77 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. O coeficiente de variação (CV) das amostragens dos náuplios em todos os testes manteve-se abaixo de 15%. As cartas-controlre dos testes de sensibilidade revelaram que os resultados obtidos estavam dentro do limite de  $\pm 2 \text{ DP}$  (Figura 4.2). Para a  $CE_{50-72h}$  e  $CL_{50-72h}$  foram obtidos CV de 23,77% e de 23,87%, respectivamente, valores dentro do critério de aceitação ( $CV \leq 30\%$ ) estabelecido para testes com substâncias de referências (EC, 1990). Convertendo-se os valores em função do íon  $Zn^{2+}$ , foram obtidas  $CE_{50-72h}$  de 0,72 e  $CL_{50-72h}$  de 0,73  $\text{mg L}^{-1}$ .



**Figura 4.2-** Cartas-controlre com os valores de  $CE_{50}$  (A) e  $CL_{50}$  (B) obtidos para *T. biminiensis* após exposição a diferentes concentrações do sulfato de zinco heptahidratado. Linhas pontilhadas indicam limites referentes a  $\pm 2 \text{ DP}$ .

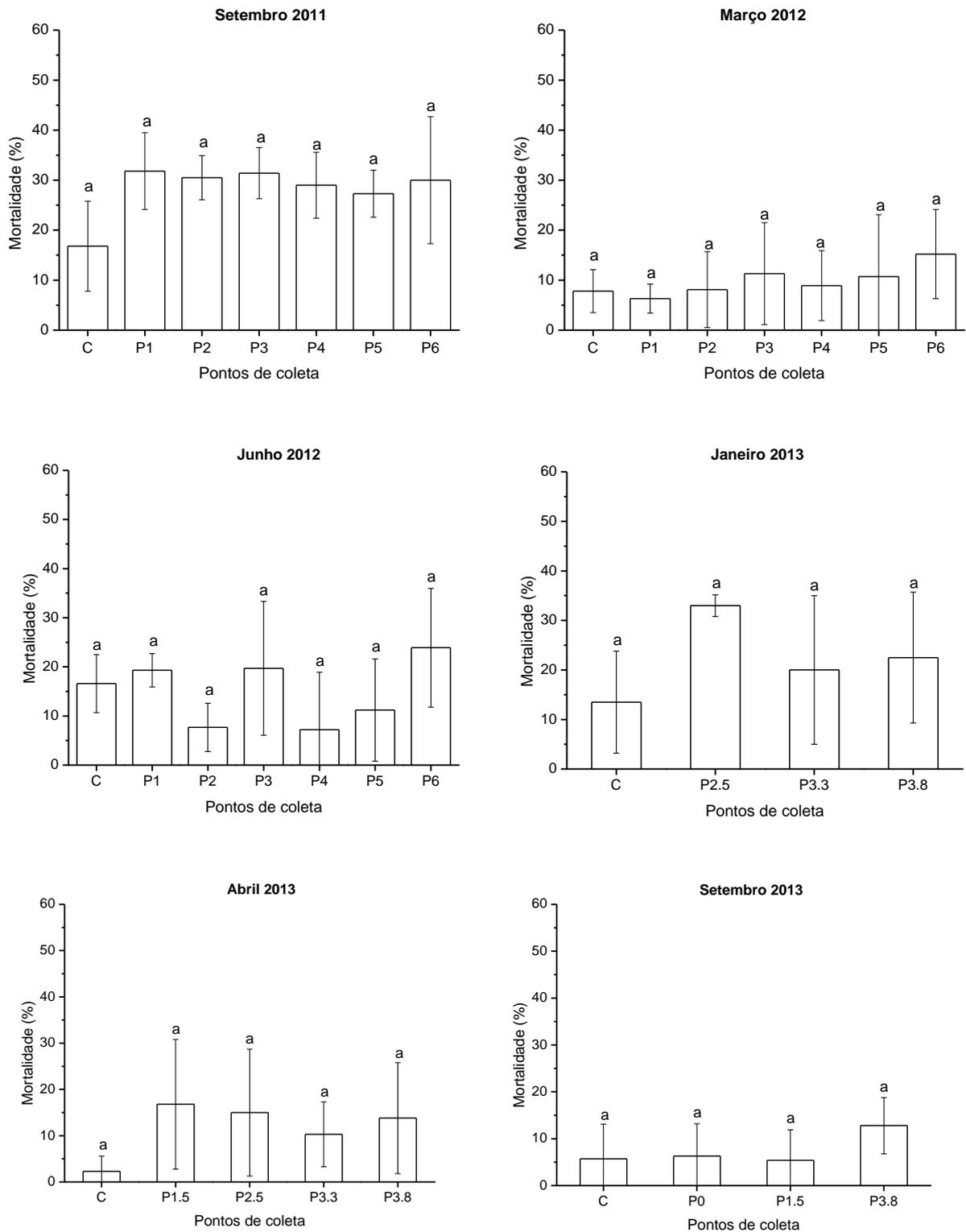
#### 4.4.3 Amostras ambientais

Os resultados obtidos para os três parâmetros estudados estão nas figuras 4.3, 4.4 e 4.5. Não foi observada mortalidade (toxicidade letal) em nenhum dos pontos analisados durante as seis coletas realizadas em Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013 (Figura 4.3).

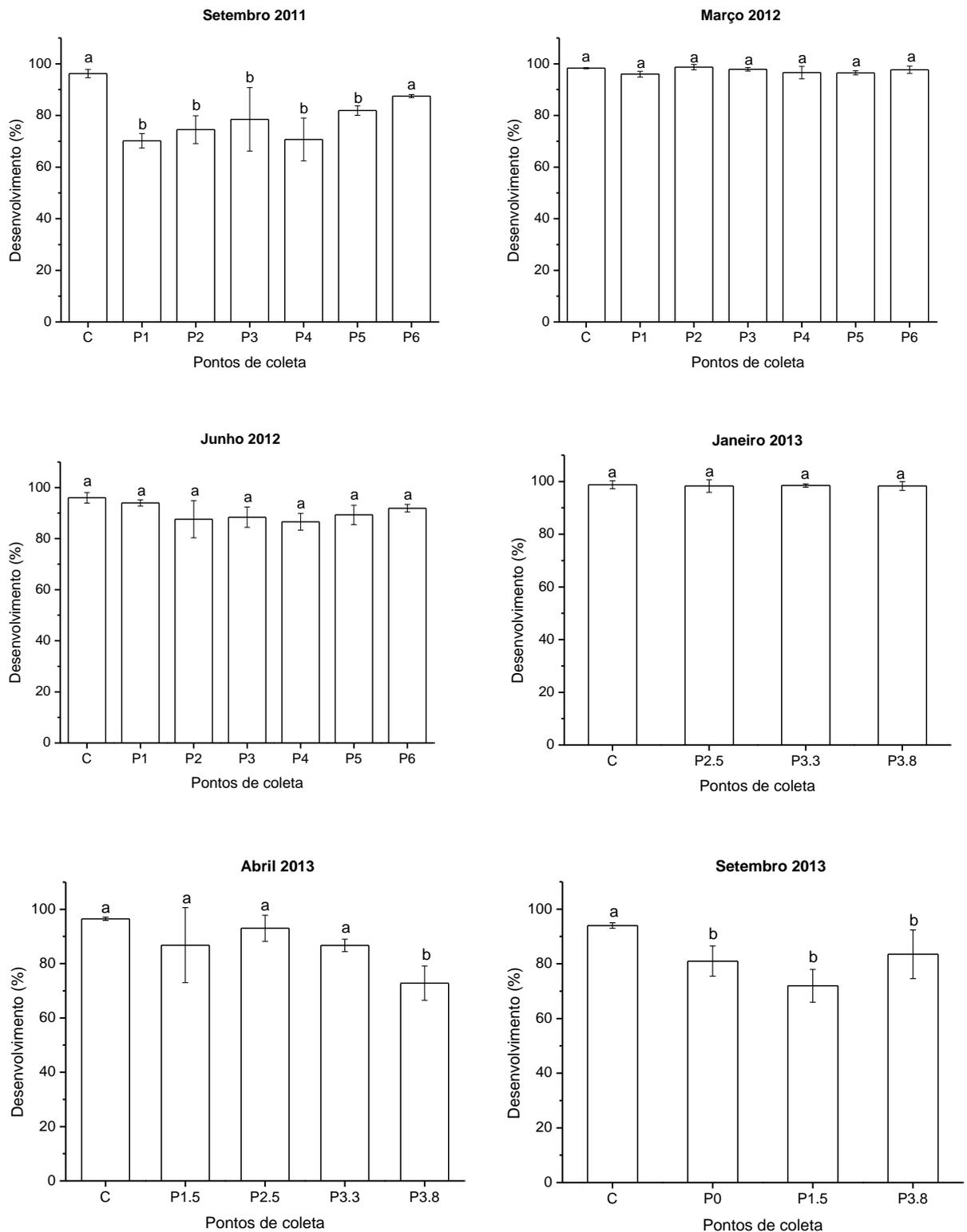
Em Setembro de 2011 (P1 a P6), os resultados obtidos para desenvolvimento (Figura 4.4) e inibição do desenvolvimento (Figura 4.5) foram semelhantes. A análise estatística demonstrou que todos os pontos foram diferentes do controle para inibição (P1 a P6), porém para o desenvolvimento, não foi observada toxicidade no P6.

Em Março e Junho de 2012 (P1 a P6) e em Janeiro de 2013 (P2.5, P3.3, P3.8), constatou-se ausência de toxicidade em todas as amostras coletadas em Suape utilizando o teste com náuplios de *T.biminiensis*, pois não foram observadas diferenças significativas entre os pontos e o controle considerando todos os parâmetros utilizados (Figuras 4.4 e 4.5).

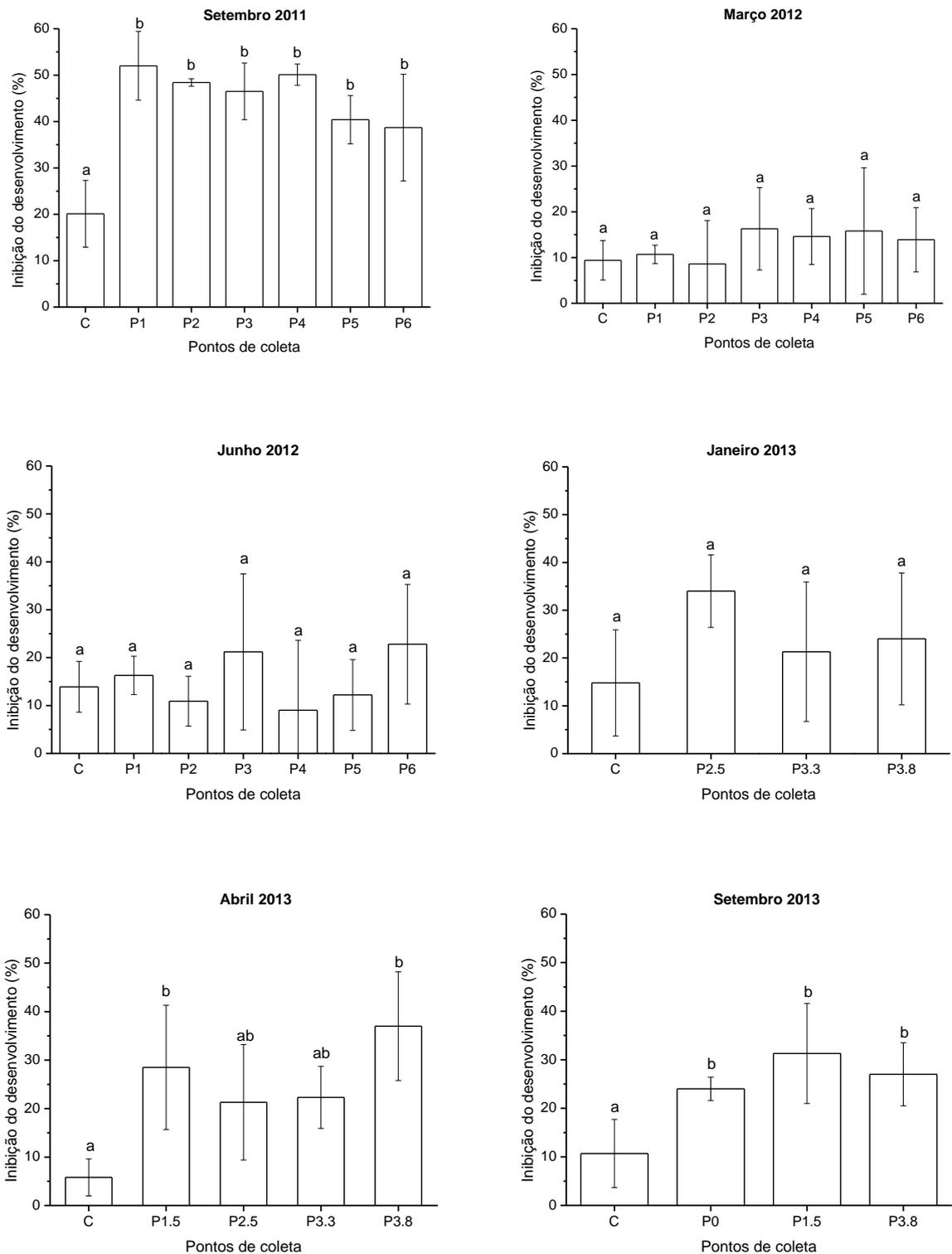
Algumas amostras coletadas em Abril e em Setembro de 2013 apresentaram toxicidade para os náuplios de *T. biminiensis*. Em Abril (P1.5, P2.5, P3.3, P3.8), foram observadas diferenças significativas para o ponto P3.8, na saída do rio Massangana, considerando o desenvolvimento (Figura 4.4) e para os pontos P1.5, na saída do rio Tatuoca, e P3.8, considerando a inibição do desenvolvimento (Figura 4.5). Todos os pontos (P0, P1.5 e P3.8) coletados em Setembro de 2013 apresentaram toxicidade quando comparados ao controle para o desenvolvimento e a inibição. O resumo dos resultados obtidos para os três parâmetros encontra-se na tabela 4.4



**Figura 4.3-** Média  $\pm$  erro-padrão do percentual de mortalidade dos náuplios de *Tisbe biminiensis* no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.



**Figura 4.4-** Média  $\pm$  erro-padrão do percentual de desenvolvimento dos náuplios de *Tisbe biminiensis* no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.



**Figura 4.5-** Média  $\pm$  erro-padrão do percentual de inibição do desenvolvimento dos náuplios de *Tisbe biminiensis* no controle e nos pontos coletados no complexo estuarino de Suape entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013. Letras indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )- Teste de Tukey.

**Tabela 4.4-** Resultados da ANOVA (F,  $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) baseados nos parâmetros percentuais obtidos nos ensaios ecotoxicológicos com *T. biminiensis* utilizando amostras de água superficial de Suape coletada entre Setembro de 2011 e Setembro de 2013.

Coleta	Setembro 2011	Março 2012	Junho 2012	Janeiro 2013	Abril 2013	Setembro 2013
Pontos coletados	P1,P2,P3,P4,P5,P6	P1,P2,P3,P4,P5,P6	P1,P2,P3,P4,P5,P6	P2.5, P3.3, P3.8	P1.5, P2.5, P3.3, P3.8	P0, P1.5, P3.8
Parâmetro	SDS	SDS	SDS	SDS	SDS	SDS
M (%)	(F=1,6904; p=0,1912)	(F=0,5192; p=0,7883)	(F=1,4119; p=0,2731)	(F=2,0574; p=0,1590)	(F=1,0719; p=0,4078)	(F=1,0789; p=0,3990)
D (%)	P1,P2,P3,P4,P5 (F=8,7578; p=0,0005)	SDS (F=2,4233; p=0,0611)	SDS (F=2,9627; p=0,0408)	SDS (T=0,212; p=0,9756)	P3.8 (F=5,9945; p=0,0053)	P0, P1.5, P3.8 (F=7,1204; p=0,0066)
I (%)	P1,P2,P3,P4,P5,P6 (F=9,8810; p=0,00032)	SDS (F=0,4911; p=0,8059)	SDS (F=0,7834; p=0,571)	SDS (F=1,9364; p=0,1770)	P1.5,P3.8 (F=5,2009; p=0,0090)	P0, P1.5, P3.8 (F=5,0911; p=0,0187)

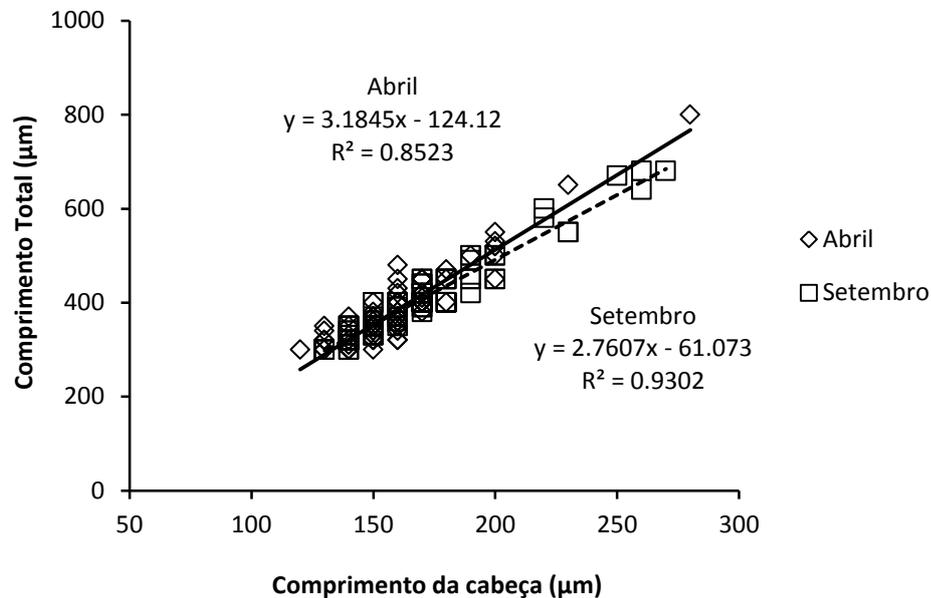
M: Mortalidade; D: Desenvolvimento de náuplios para copepoditos; I: Inibição do desenvolvimento; SDS: Sem diferenças significativas.

#### 4.4.4 Avaliação do crescimento e do estágio de desenvolvimento dos copepoditos

O aprimoramento do protocolo do teste com náuplios de *T. biminiensis* através da inclusão de novos parâmetros de toxicidade (medição da cabeça e do comprimento total dos copepoditos, bem como a observação do seu estágio de desenvolvimento) foi precedida de uma avaliação destes parâmetros nos copepoditos expostos aos controles (água do mar filtrada) dos testes realizados paralelamente aos das amostras ambientais coletadas em Abril e Setembro de 2013.

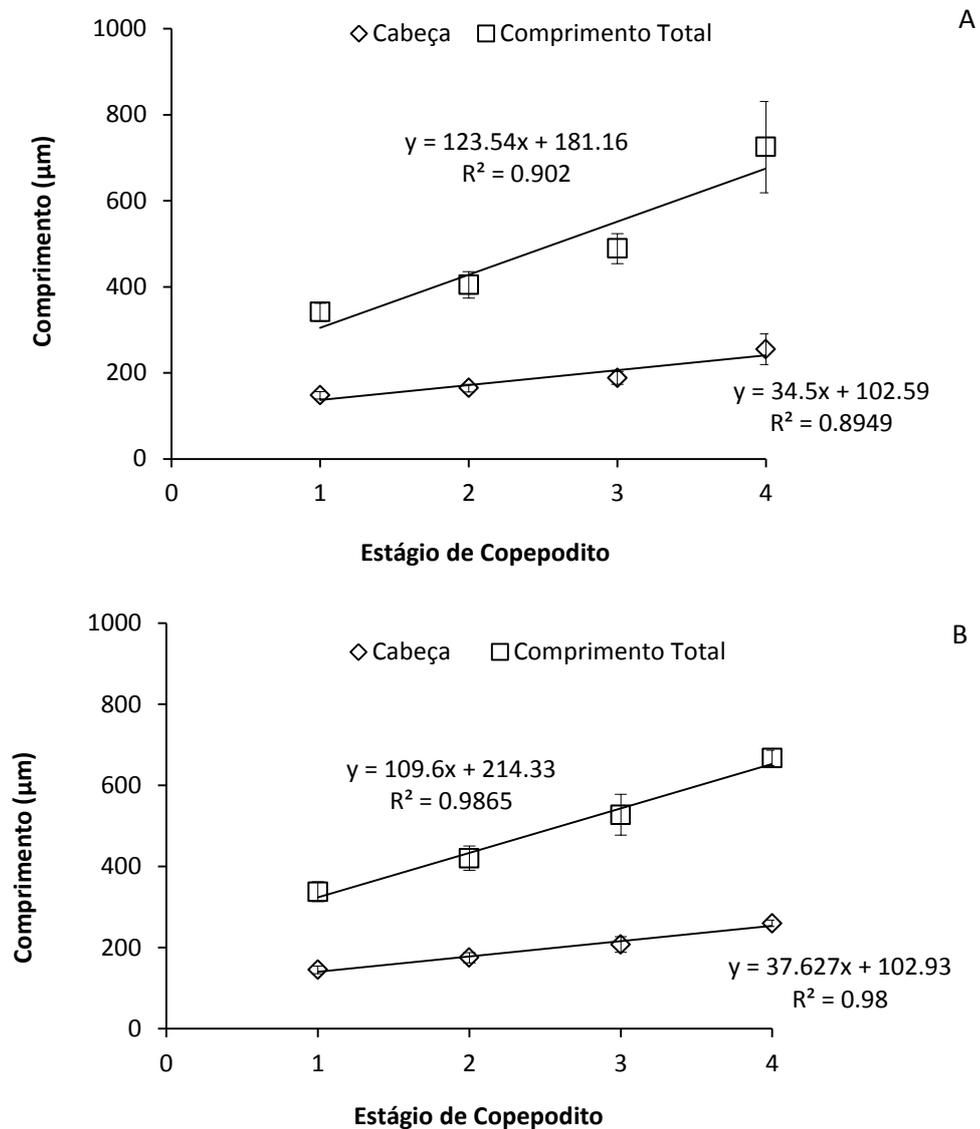
A partir da distribuição dos resultados das medições do comprimento total e da cabeça dos copepoditos nos controles dos dois meses estudados foi construída uma linha de tendência que indicou uma forte correlação linear positiva entre as duas variáveis (Figura 4.6), apresentando um coeficiente de determinação de 0.8523 e de 0.9302 para os controles dos meses de Abril e Setembro de 2013, respectivamente. A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa quando os coeficientes de regressão foram comparados ( $t=2,9215$ ;  $p=0,0041$ ), indicando que a relação entre o comprimento total e da cabeça dos copepoditos dos controles são diferentes para cada teste. Deste modo, foi definido que as

comparações entre as medidas de crescimento devem ser feitas entre as amostras e o controle de um mesmo teste.



**Figura 4.6-** Regressão linear entre o comprimento total e da cabeça para copepoditos de *Tisbe biminiensis* obtidos nos controles dos meses de Abril e Setembro de 2013.

Observou-se que ambos os parâmetros de crescimento possuem relações lineares positivas com o estágio de desenvolvimento dos copepoditos expostos à água controle nos meses de Abril e Setembro de 2013 (Figura 4.7). As inclinações das retas entre o comprimento da cabeça e o estágio de desenvolvimento foram menores que aquelas entre o comprimento total e o estágio de desenvolvimento. Observou-se também que cada estágio de desenvolvimento dos copepoditos apresenta uma média de tamanho específica, seja total ou da cabeça. Diante disto, indica-se que as medidas sejam obtidas dos diferentes estágios de desenvolvimento de copepoditos dentro de um mesmo experimento.



**Figura 4.7-** Médias do comprimento total e da cabeça para os copepoditos de *Tisbe biminiensis* nos diferentes estágios de desenvolvimento nos controles em Abril (A) e Setembro (B) de 2013.

Considerando as amostras coletadas em Suape em Abril e Setembro de 2013, as médias de comprimento total e da cabeça dos copepoditos e os resultados da análise estatística para estes parâmetros encontram-se na tabela 4.5. Em Abril de 2013, a análise estatística dos parâmetros não indicou toxicidade em nenhum dos pontos estudados quando comparados ao controle. Logo, as médias de tamanho não foram um parâmetro tão sensível aos contaminantes presentes nas amostras deste mês, uma vez que não indicaram a toxicidade verificada nos pontos P1.5 e P3.8 pelos parâmetros de desenvolvimento e de inibição.

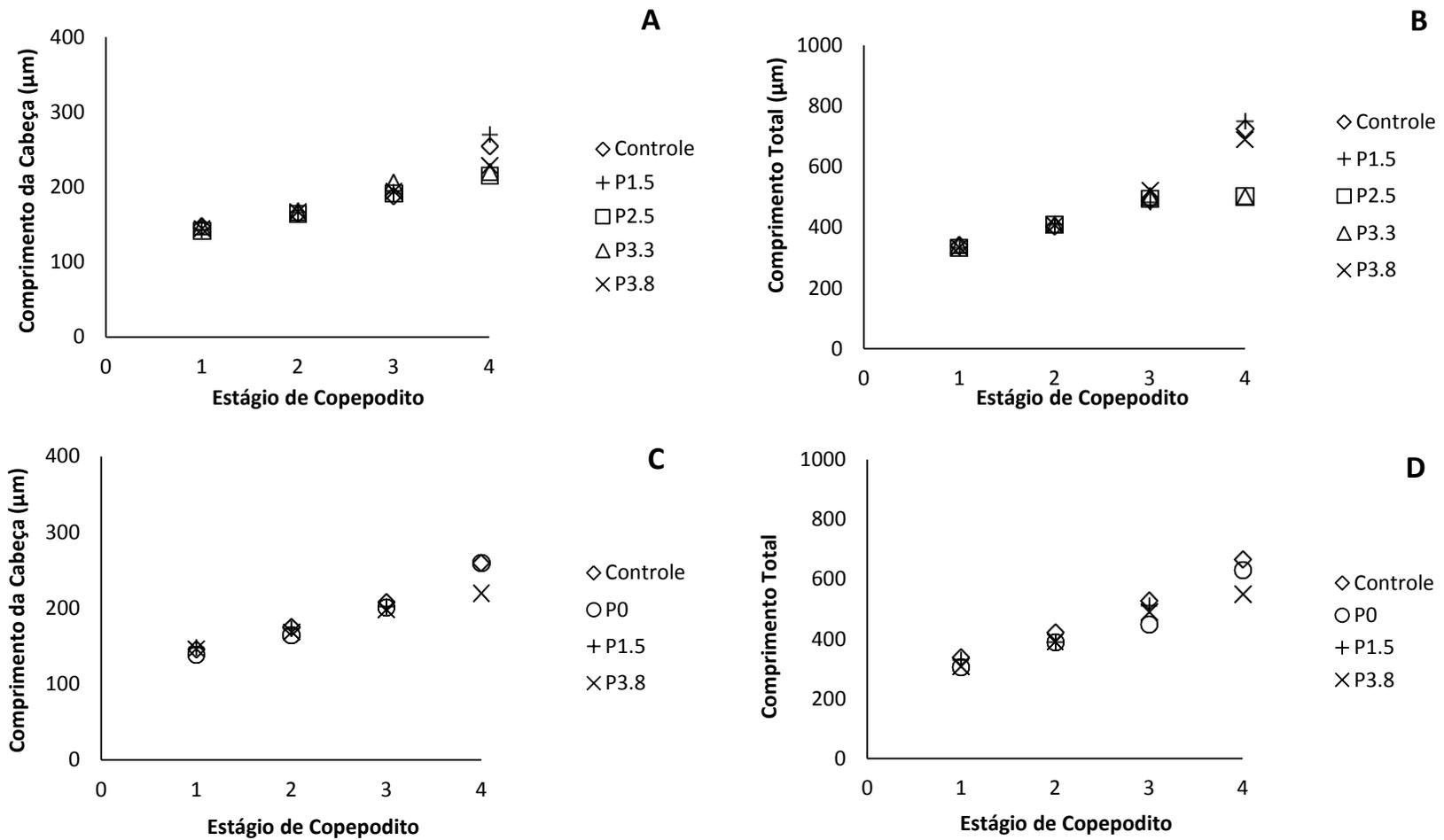
Entretanto, para as amostras de Setembro de 2013, ambos os parâmetros de tamanho e a relação C/T confirmaram a toxicidade sub-letal observada em todos os pontos estudados neste período.

**Tabela 4.5-** Resultados da ANOVA (F,  $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) baseados nas médias dos comprimentos total e da cabeça ( $\mu\text{m}$ ) dos copepoditos de *T. biminiensis* observados nos ensaios com amostras de água superficial de Suape coletadas nos meses de Abril e Setembro de 2013.

	Abril 2013			Setembro 2013		
	Total	Cabeça	C/T	Total	Cabeça	C/T
C	378 ± 69	157 ± 20	0,42 ± 0,03	405 ± 85	168 ± 30	0,42 ± 0,04
P0	-	-	-	362 ± 79*	158 ± 30*	0,44 ± 0,02*
P1.5	376 ± 78	157 ± 22	0,42 ± 0,05	361 ± 55*	159 ± 17*	0,44 ± 0,02*
P2.5	363 ± 61	151 ± 20	0,42 ± 0,03	-	-	-
P3.3	375 ± 57	158 ± 20	0,42 ± 0,02	-	-	-
P3.8	383 ± 97	157 ± 24	0,42 ± 0,03	374 ± 72*	164 ± 20	0,44 ± 0,03*
SDS	SDS	SDS	SDS	P0, P1.5, P3.8	P0, P1.5	P0, P1.5, P3.8
	(T=7,5608, p=0,1091)	(F=2,0372, p=0,0866)	(T=.2,4281, p=0,6576)	(T=41,16, p≤0,0001)	(T=20,33, p≤0,0001)	(T=59,472, p≤0,0001)

C: amostra controle; C/T: Relação Comprimento da cabeça e total; SDS: Sem diferenças significativas; (-) Ponto não avaliado. (\*) Diferença significativa em relação ao controle.

As médias do comprimento total e da cabeça por estágio de desenvolvimento dos copepoditos dos controles e dos pontos coletados em Suape encontram-se na figura 4.8 e os resultados da análise estatística na tabela 4.6. Em Abril, apenas o tamanho médio da cabeça dos copepoditos no estágio C1 dos pontos P1.5 e P2.5 apresentaram-se menores e estatisticamente diferentes do controle. Em Setembro de 2013 foi verificada redução significativa para o tamanho médio da cabeça dos copepoditos nos estágios C1 e C2 do ponto P0 comparada a do controle. Considerando o comprimento total de copepoditos por estágio para este mesmo mês, observou-se que os copepoditos em estágio C1 dos pontos P0 e P3.8 foram menores que o do controle. Todos os pontos coletados apresentaram copepoditos em estágio C2 menores em relação ao controle. Para o estágio de C3, apenas o P0 apresentou diferença significativa quando comparado ao controle.



**Figura 4.8-** Médias dos comprimentos dos copepoditos de *T.biminiensis* em diferentes estágios de desenvolvimento. Comprimento da cabeça (A) e total (B) dos copepoditos expostos às amostras do mês de Abril. Comprimento da cabeça (C) e total (D) dos copepoditos expostos às amostras de Setembro de 2013.

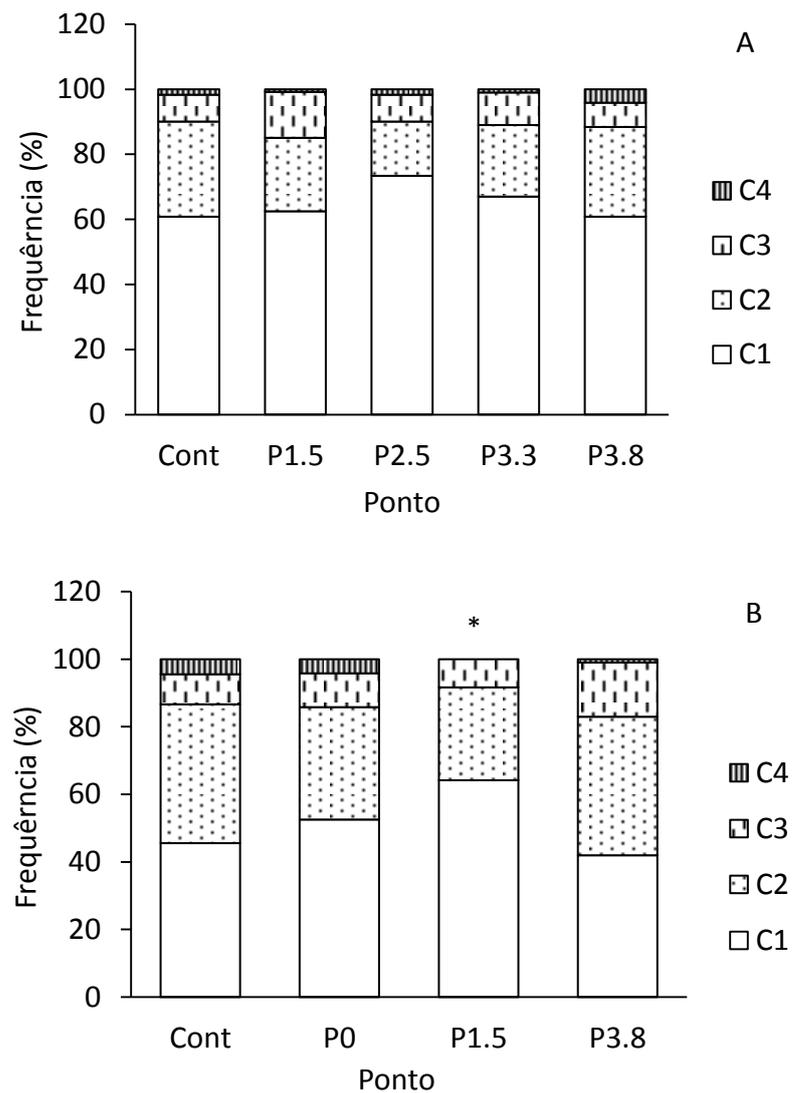
**Tabela 4.6-** Resultados da ANOVA (F,  $\alpha=0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (T) obtidos a partir das médias de comprimento total e da cabeça para cada estágio de copepoditos observado ao final dos ensaios ecotoxicológicos com *T. biminiensis* com as amostras de Suape coletadas nos meses de Abril e Setembro de 2013.

	<i>Copepodito 1</i>		<i>Copepodito 2</i>		<i>Copepodito 3</i>		$\geq$ <i>Copepodito 4</i>	
	<i>Cabeça</i>	<i>Total</i>	<i>Cabeça</i>	<i>Total</i>	<i>Cabeça</i>	<i>Total</i>	<i>Cabeça</i>	<i>Total</i>
<i>Abr.</i>	T=23,3588	T=11,6801	F=1,8479	F=0,4171	F=,2,5347	F=0,811	F=0,4424	F=0,8646
2013	p $\leq$ 0,0001	p=0,0199	p=0,1221	p=0,7982	p=0,0501	p=0,5257	p=0,665	p=0,5296
<i>C</i>	148 $\pm$ 9	341 $\pm$ 21	165 $\pm$ 9	405 $\pm$ 31	188 $\pm$ 15	489 $\pm$ 35	255 $\pm$ 35	725 $\pm$ 106
<i>P1.5</i>	144 $\pm$ 9*	334 $\pm$ 38	167 $\pm$ 7	413 $\pm$ 16	192 $\pm$ 10	484 $\pm$ 78	270#	750#
<i>P2.5</i>	142 $\pm$ 11*	334 $\pm$ 28	164 $\pm$ 8	410 $\pm$ 26	192 $\pm$ 13	494 $\pm$ 38	215 $\pm$ 21	505 $\pm$ 134
<i>P3.3</i>	148 $\pm$ 8	343 $\pm$ 22	167 $\pm$ 7	404 $\pm$ 32	202 $\pm$ 9	502 $\pm$ 23	220#	500#
<i>P3.8</i>	145 $\pm$ 8	336 $\pm$ 28	162 $\pm$ 9	412 $\pm$ 25	194 $\pm$ 11	522 $\pm$ 62	228 $\pm$ 50	712 $\pm$ 240
<i>Set.</i>	T=61,2423	T=99,224	T=14,2129	T=25,584	T=3,2084	T=18,687	F=0	F=4,4872
2013	p $\leq$ 0,0001)	p $\leq$ 0,0001	p=0,0026	p $\leq$ 0,0001	p=0,3606	p=0,0003	p=0,9955	p=0,0701
<i>C</i>	145 $\pm$ 9	338 $\pm$ 24	175 $\pm$ 12	421 $\pm$ 30	207 $\pm$ 19	527 $\pm$ 51	260 $\pm$ 8	667 $\pm$ 19
<i>P0</i>	139 $\pm$ 6*	306 $\pm$ 11*	164 $\pm$ 13*	389 $\pm$ 35*	201 $\pm$ 8	449 $\pm$ 22*	260 $\pm$ 14	630 $\pm$ 31
<i>P1.5</i>	148 $\pm$ 5	329 $\pm$ 16	172 $\pm$ 7	389 $\pm$ 16*	202 $\pm$ 4	511 $\pm$ 24	-	-
<i>P3.8</i>	146 $\pm$ 7	308 $\pm$ 11*	169 $\pm$ 8	391 $\pm$ 28*	198 $\pm$ 9	490 $\pm$ 52	220#	550#

(\*) Diferença estatística significativa. (#) Apenas um indivíduo, não entrou na análise estatística. (-) Não apresentou o estágio.

A análise da composição percentual em relação aos estágios de desenvolvimento dos copepoditos de *T. biminiensis* do controle e das amostras coletadas em Suape de 2013 (Figura 4.9A) demonstrou que no mês de Abril de 2013 houve um padrão semelhante de composição quanto ao desenvolvimento (teste G,  $p \geq 0,05$ ).

Para o mês de Setembro de 2013 (Figura 4.9B), foi verificado que o P1.5 apresentou diferença na frequência dos estágios de copepoditos em relação aos demais pontos e ao controle (G=11,0268;  $p=0,0116$ ) com maior incidência do estágio de copepodito C1, confirmando os resultados observados para este ponto quando utilizados os parâmetros de percentual de desenvolvimento, inibição do desenvolvimento, comprimento total e da cabeça e relação C/T.



**Figura 4.9-** Composição percentual das amostras e do controle em relação ao estágio de desenvolvimento dos copepoditos de *T. biminiensis* nos meses de Abril (A) e Setembro (B) de 2013. (\*) Diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados da toxicidade das amostras coletadas no complexo estuarino de Suape para os diferentes parâmetros avaliados no teste com o copépodo *T. biminiensis* encontram-se resumidamente expostos na tabela 4.7.

**Tabela 4.7**– Resumo dos resultados da toxicidade das amostras coletadas no complexo estuarino de Suape para os diferentes parâmetros avaliados no teste com o copépodo *T. biminiensis*.

<i>Parâmetro</i>	<i>Abril 2013</i>	<i>Setembro 2013</i>
<i>M (%)</i>	SDS	SDS
<i>D (%)</i>	P3.8	P0, P1.5, P3.8
<i>I (%)</i>	P1.5, P3.8	P0, P1.5, P3.8
<i>Comprimento total (µm)</i>	SDS	P0, P1.5, P3.8
<i>Comprimento cabeça (µm)</i>	SDS	P0, P1.5
<i>C/T</i>	SDS	P0, P1.5, P3.8
<i>Frequência dos estágios</i>	SDS	P1.5
<i>Comprimento médio total por estágio</i>	SDS	P0 (C1,C2,C3) P1.5 (C2) P3.8 (C1,C2)
<i>Comprimento médio da cabeça por estágio</i>	P1.5, P2.5 (C1)	P0 (C1,C2)

M: Mortalidade; D: Desenvolvimento de náuplios para copepoditos; I: Inibição; C/T: Relação comprimento da cabeça e total; SDS: Sem diferenças significativas.

#### 4.5 Discussão

Os resultados dos testes de sensibilidade com o zinco obtidos neste trabalho ( $CE_{50-72h}$  de  $0,72 \pm 0,17$  e  $CL_{50-72h}$  de  $0,73 \pm 0,17$  mg L<sup>-1</sup> de Zn<sup>2+</sup>) são similares aos apresentados por Lavorante et al. (2013) que, estudando náuplios da mesma espécie de copépodo, relataram valores de  $0,75 \pm 0,13$  e de  $0,79 \pm 0,16$  mg L<sup>-1</sup> de Zn<sup>2+</sup> para  $CE_{50-72h}$  e  $CL_{50-72h}$ , respectivamente, indicando uma sensibilidade normal dos náuplios usados nos testes com amostras ambientais.

Segundo dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC, 2014), apesar da pluviometria nos meses de coleta ser considerada similar aos índices históricos já registrados para a região com época chuvosa de março a agosto e seca de setembro a fevereiro, vale ressaltar alguns aspectos importantes. O ano de 2011 (total anual de 2451,3 mm), devido ao elevado índice pluviométrico, foi considerado um ano chuvoso. O ano de 2012 foi considerado o mais seco da década (total anual de 1315,9 mm) e foi registrado o mês de Março mais seco dos últimos dez anos (48,6 mm). O mês de Junho (317,6 mm) apresentou pluviometria similar aos registros encontrados para a região neste período. Em 2013 (1924,7 mm), o mês de Abril foi considerado com padrão normal de chuvas e o mês de Setembro foi considerado mais chuvoso (153,6 mm) que o normalmente observado para este mês.

Neste trabalho, considerando os parâmetros percentuais de desenvolvimento de copepoditos e inibição do desenvolvimento, foi observada toxicidade para os náuplios de *T. biminiensis* em todas as amostras coletadas em Suape em Setembro de 2011 e Setembro de 2013, mês que marca o início do período seco da região. Os resultados das amostras coletadas em Setembro de 2011 (período seco) e Março de 2012 (período chuvoso) indicam redução da toxicidade da água no decorrer do período seco. No entanto, apesar da verificação de toxicidade nas amostras coletadas em Setembro de 2013, não houve coleta de amostras nos meses subsequentes para confirmar este padrão de diminuição. Ressalta-se que, por questões logísticas, a coleta das amostras de Janeiro de 2013 foi realizada logo após a maré alta, fato que pode ter influenciado a toxicidade das mesmas, pois não foi verificada toxicidade das amostras neste período. Foi constatada toxicidade para os náuplios de *T. biminiensis* nas amostras coletadas em Abril de 2013, mês incluso do período chuvoso (Março-Agosto), nas amostras coletadas nas saídas dos rios Massangana (P3.8) e Tatuoca (P1.5), sendo observada chuva durante a coleta.

Pessoa (2009) afirma que os estuários dos rios Massangana e Tatuoca são fortemente influenciados pela carga de efluentes industriais e impactos relacionados à frequente dragagem observada na região. Os afluentes do rio Massangana também apresentam intensa atividade industrial. Mendonça (2005) avaliou a qualidade da água do riacho Algodois, tributário do rio Massangana, e a eficiência de tratamento de efluentes nele lançados por três indústrias de diferentes tipologias (bebidas, metalúrgica e têxtil) usando o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* como espécies indicadoras. Foi verificada toxicidade letal no riacho, principalmente usando a fotobactéria *V. fischeri*, e toxicidade para ambos os organismos nos efluentes das três empresas.

Outro aspecto importante é o fato de que, segundo o Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, o mês de Setembro marca também o início da colheita de cana-de-açúcar em Pernambuco que pode se estender até meados de Abril (IPA, 2014). No litoral sul de Pernambuco é abundante o cultivo da cana-de-açúcar devido à proximidade de rios que suprem a necessidade de um fornecimento hídrico adequado e, apesar deste setor ter sofrido grande declínio ao longo dos anos, a agroindústria canavieira (canaviais, usinas e destilarias) exerce grande impacto social e ecológico para a região (CPRH, 2001). Gouveia (2010) afirma que ao longo do percurso da área banhada pelos rios da região de Suape, especialmente o Ipojuca, o Merepe, o Massangana e o Tatuoca, há forte presença de “cana-ciliar”, ou seja, uma substituição da mata ciliar pela cultura canavieira. O autor também relata que há indícios de lançamento de vinhaça nos corpos d’água. Com o início da safra são realizadas as

queimadas para o corte manual da cana pelos trabalhadores rurais, paralelo a isto, também se iniciam as atividades sucroalcooleiras. Deste modo, são necessários estudos que busquem avaliar a relação desta atividade com a toxicidade verificada nas amostras de água coletadas no mês de Setembro na região.

Souza-Santos e Araújo (2013) realizaram um estudo ecotoxicológico das águas superficiais de Suape empregando o teste embrio-larval com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, coletando amostras nos meses de Maio, Agosto, Outubro e Dezembro de 2007. As amostras do rio Massangana apresentaram toxicidade crônica para as larvas em todos os meses de coleta, contemplando a estação seca e a chuvosa. O mês de Outubro de 2007, período seco, apresentou os maiores níveis de toxicidade em toda a área estudada. Os dados levam os autores a supor que os poluentes lançados no rio Massangana, no período seco, poderiam alcançar pontos localizados no estuário de Suape e afetar as águas do rio Tatuoca, fato que pode ser estar associado ao maior fluxo de água do Massangana quando comparado ao rio Tatuoca e ao padrão de circulação das águas da região, que segundo Moacyr Araújo (Dados não publicados), ocorre da direção Norte para Sul. Outra hipótese levantada pelos autores é a de que o rio Tatuoca também pode ser uma fonte de poluição para a área já que sua origem é cercada por rodovias e próxima a indústrias e plantações de cana-de-açúcar cujos rejeitos poderiam ser transportados até as águas do rio Tatuoca durante chuvas intensas. Desta forma, os autores sugerem que os poluentes presentes nas águas dos rios no período chuvoso são concentrados com o início da estação seca, acarretando maior toxicidade na região neste período, porém, com o passar da estação seca, este efeito seria reduzido gradativamente.

Oliveira (2011) observou um padrão semelhante de sensibilidade das larvas do ouriço-do-mar *L. variegatus* e dos náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis* empregando amostras de água coletadas entre 2009 e 2010 na região de Suape. Esta autora, no entanto, utilizou os náuplios isoladamente em placas multipoços. O rio Tatuoca foi considerado menos tóxico que o rio Massangana, que apresentou toxicidade para os dois organismos utilizados em todas as coletas de 2009. Os demais pontos localizados no canal formado entre Suape e a Ilha de Cocais apresentaram toxicidade principalmente para os náuplios de *T. biminiensis*. A autora verificou que um maior número de amostras tóxicas foi observado nos meses de Abril e Outubro de 2009, sendo a toxicidade reduzida em Dezembro de 2009 e Fevereiro de 2010.

Utilizando a microalga *Thalassiosira weissflogii* para avaliar a toxicidade das águas superficiais no estuário de Suape nos meses de Julho, Setembro e Novembro de 2010 e Janeiro e Setembro de 2011, Araújo e Souza-Santos (2013) também observaram que a

toxicidade variou de acordo com o mês de coleta. Como quatro dos cinco meses que ocorreram coletas pertencem ao período seco, não foi possível relacionar a presença de toxicidade com a pluviometria, entretanto observou-se que todos os pontos coletados em Setembro de 2010 e no mesmo mês de 2011 apresentaram maior toxicidade. As autoras também propuseram que a chuva carregaria mais poluentes para a região no período chuvoso, mas estes se concentrariam no início da seca causando toxicidade e que com o passar do período seco a toxicidade sofreria uma redução.

Estes trabalhos supracitados corroboram a hipótese de que a toxicidade observada nas águas da região está associada aos rios, principalmente ao Massangana, e de que a mesma se intensifica no início do período seco, sobretudo nos meses de Setembro-Outubro. É possível indicar que, ao longo destes estudos, vem sendo observado um comprometimento toxicológico moderado e variável das águas da área estuarina de Suape.

Em relação aos parâmetros adicionados ao teste com náuplios de *T. biminiensis*, o comprimento total e da cabeça de todos os copepoditos foram isometricamente relacionados, já que a relação linear explicou bem esta relação. No presente estudo, ambos os parâmetros apresentaram relação linear com o estágio de desenvolvimento no controle, indicando que ambos podem ser utilizados como critérios para indicação de crescimento e verificação da toxicidade de uma amostra ambiental através da observação de alterações nestas relações quando os organismos forem expostos às substâncias tóxicas presentes nas amostras. Embora o comprimento total tenha se mostrando mais sensível no presente estudo e apresente um aumento mais acentuado com o desenvolvimento dos copepoditos, uma vez que há um incremento no número de segmentos no urossoma a cada muda sofrida para mudança de estágio (Volkmann-Rocco, 1973), o tamanho da cabeça também pode ser utilizado como parâmetro.

A relação entre as duas medidas (comprimento da cabeça/comprimento total) também demonstrou sensibilidade semelhante ao comprimento total. No entanto, as comparações das medidas da cabeça e do comprimento total devem ser realizadas entre os pontos e o controle de cada teste, uma vez que pode haver diferenças entre os coeficientes de regressão das retas dos controles. Estas diferenças podem ser explicadas por uma série de fatores, incluindo fatores extrínsecos, como a qualidade da água controle, da alimentação e dos fatores ambientais, como fatores intrínsecos à população, como a história recente dos cultivos e variação entre sub-populações de um mesmo cultivo.

Em relação aos parâmetros adicionados e as amostras ambientais coletadas em Suape, foram observados diferentes resultados para os meses de Abril e Setembro de 2013. Para o

mês de Abril de 2013 o parâmetro do comprimento médio da cabeça dos copepoditos de primeiro estágio (C1) indicou toxicidade para P1.5. e P2.5. Ressalta-se que a toxicidade do P2.5 ainda não tinha sido observada para os demais parâmetros. Para o P3.8 nenhum dos parâmetros adicionais indicou a toxicidade que foi verificada para o desenvolvimento e a inibição. Deste modo apenas a medida da cabeça dos copepoditos em estágio C1 foi adequada para indicação da toxicidade em um dos pontos coletados.

Para as amostras coletadas em Setembro de 2013, o comprimento total dos copepoditos, a relação C/T e o comprimento total no estágio C2 confirmaram as respostas tóxicas para todas as amostras também detectadas pelos parâmetros de desenvolvimento e inibição. Observa-se que, dos nove parâmetros observados, sete indicaram toxicidade do P0 e do P1.5 e cinco do P3.8 coletados em Setembro de 2013. Estes resultados indicam que as substâncias tóxicas presentes nas amostras coletadas neste mês promoveram efeitos tóxicos tanto para o crescimento quanto para o desenvolvimento dos copepoditos.

Estes dados também evidenciam que parâmetros de crescimento e de desenvolvimento podem fornecer resultados diferentes e independentes. Estudando os efeitos da ciproterona, hormônio de efeito antiandrogênico, sobre o microcrustáceo *Daphnia magna*, LeBlanc e McLachlan (1999) observaram que pode haver redução do crescimento dos organismos sem efeito sobre a muda, ou seja, os dafnídeos apresentavam nanismo. Estes autores afirmam assim que a utilização de parâmetros de crescimento e de desenvolvimento constituem diferentes ferramentas para avaliação da toxicidade dependendo do tipo de substância tóxica presente em amostras ambientais.

Williams (1992) observou a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento dos náuplios do copépodo *Tisbe battagliai* expostos às amostras de água e elutriato em placas multiposos após 96h. Os autores afirmam que o crescimento (dos náuplios e dos copepoditos) e o desenvolvimento (observação do estágio naupliar ou de copepoditos) constituem ferramentas importantes para observação de efeitos subletais, no entanto, indicam que é necessária melhor compreensão destes parâmetros devido a maior possibilidade de interação com algumas variáveis ambientais. No teste citado, utilizou-se exposição constante à luz e amostras de origem marinha e costeira. O excesso de nutrientes das amostras costeiras e o excesso de luz poderiam ter estimulado o crescimento da alga adicionada como alimento e os copépodos teriam acesso a maiores quantidades de alimento durante o teste, o que teria acarretado maior variabilidade nos resultados. Os autores concluem que o parâmetro de desenvolvimento larval é comparável ao da medida de comprimento e que o teste com

náuplios de *T. battagliai* é sensível, relativamente rápido, de baixo custo e requer equipamentos simples para sua execução.

Os novos parâmetros de desenvolvimento e crescimento adicionados ao teste com náuplios de *T. biminiensis* forneceram resultados variáveis quanto aos meses de coleta. Deste modo, são necessários mais estudos acerca da utilização destes parâmetros no teste. A medição dos copepoditos constituiu uma etapa laboriosa e, dependendo das substâncias tóxicas presentes nas amostras, a obtenção deste parâmetro não garante a aquisição de informações adicionais quanto à toxicidade. No presente estudo isto só ocorreu em uma estação e mês. Deve-se, no entanto, considerar dois aspectos, o primeiro no sentido da necessidade de um teste prático e rápido para ser implantado na rotina pesada de um laboratório de ecotoxicologia, questão atendida com o protocolo de Lavorante et al. (2013). O segundo diz respeito a estudos mais aprofundados, como trabalhos de pesquisa, cujo objetivo é ampliar o conhecimento acerca de dada região ou composto avaliado. Neste sentido, o aprimoramento do protocolo poderia fornecer informações mais específicas a respeito da toxicidade.

Dentre os parâmetros propostos por Lavorante et al. (2013), observou-se que as substâncias tóxicas presentes nas amostras coletadas em Suape não promoveram mortalidade (efeito letal), porém o desenvolvimento e a inibição foram satisfatórios para indicação da toxicidade, apresentando sensibilidade semelhante. Diferentemente do desenvolvimento, apenas o parâmetro de inibição indicou a toxicidade para o P6 em Setembro de 2011 e para o P1.5 em Abril de 2013. No entanto, é importante observar que para cálculo da inibição faz-se necessária a obtenção de um baixo coeficiente de variação da amostragem dos náuplios, condição não requerida para cálculo do desenvolvimento. Assim, ambos os parâmetros de inibição e de desenvolvimento podem ser utilizados, contudo, para o caso de uma grande variação na amostragem indica-se a utilização do desenvolvimento dos náuplios na avaliação da toxicidade de amostras ambientais marinhas e estuarinas.

O desenvolvimento e o crescimento dos copépodos são processos regulados por hormônios responsáveis pela regulação das mudas e pelo controle da metamorfose (PORTE et al., 2006). Mecanismos necessários ao crescimento dos crustáceos, como interações com receptores ou modificações da atividade de enzimas, também podem sofrer distúrbios (LAUFER e BORST, 1988; ANDERSEN et al., 2001; OCDE, 2006). Substâncias como pesticidas, hormônios e metais podem inibir ou alterar estes processos (RODRÍGUEZ et al., 2007). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aquilfenóis e ftalatos também constituem

substâncias que podem comprometer o desenvolvimento larval de copépodos (FORGET-LERAY et al., 2005).

Diante da diversidade de atividades potencialmente poluidoras realizadas em Suape, vários agentes podem estar relacionados com a toxicidade observada nas amostras. A presença de agentes tóxicos nas águas de Suape pode gerar efeitos deletérios aos organismos da região que podem afetar várias etapas do seu ciclo de vida. Em um futuro próximo, estas comunidades bióticas poderão ser significativamente comprometidas caso estudos dos contaminantes e dos seus efeitos não sejam realizados e medidas de controle não sejam implementadas. Desta forma, são necessários mais estudos ecotoxicológicos com amostras da região para gerar informações acerca dos tipos de contaminação responsáveis pelos efeitos observados e suas consequências ambientais, bem como auxiliar nas tomadas de decisão por parte dos órgãos competentes.

#### **4.6 Conclusão**

Os náuplios de *T. biminiensis* podem ser utilizados em testes de toxicidade com amostras ambientais marinhas e estuarinas. O novo protocolo resultou na obtenção de novos parâmetros que podem ser utilizados no teste ecotoxicológico com náuplios. Apenas a medida do comprimento da cabeça por estágio de desenvolvimento dos copepoditos indicou toxicidade para o P2.5 coletado em Abril de 2013, porém mais estudos são necessários para avaliar a sensibilidade dos parâmetros adicionados frente ao aumento de trabalho prático para obtenção dos dados. Um teste mais rápido e com resultados semelhantes pode ser realizado com o emprego dos parâmetros do protocolo estabelecido inicialmente: mortalidade, desenvolvimento para copepoditos e inibição do desenvolvimento dos náuplios. A região de Suape encontra-se comprometida ambientalmente, com ocorrência de toxicidade sub-letal mais associada ao início do período seco. São necessários trabalhos de monitoramento e estudos ecotoxicológicos, bem como análises químicas e físicas para se conhecer as possíveis substâncias relacionadas com a toxicidade da região para subsidiar medidas de controle, ações preventivas e corretivas no tocante às tomadas de decisão e gestão ambiental.

## 5 CAPÍTULO III

---

Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) da água do complexo estuarino de Suape (Pernambuco, Brasil) empregando o ensaio com náuplios de *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida)

## 5.1 Resumo

O estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) é uma importante ferramenta na caracterização e identificação dos possíveis agentes causadores da toxicidade ambiental. O complexo estuarino de Suape (Pernambuco, Brasil) vem sofrendo, principalmente desde a implantação do complexo industrial de SUAPE, várias alterações ambientais. Estudos realizados na região apontam toxicidade moderada e variável em amostras de água e sedimento, porém ainda não foi possível identificar quais as substâncias estariam envolvidas. O presente trabalho objetivou avaliar e identificar a toxicidade da água superficial de Suape utilizando o protocolo de AIT. As manipulações físicas e químicas da fase de caracterização do AIT foram aplicadas às amostras tóxicas coletadas na Baía de Suape (P0) e nos estuários dos rios Tatuoca (ponto P1.5) e Massangana (ponto P3.8) nos meses de Abril e Setembro de 2013. A avaliação ecotoxicológica ocorreu antes e após as manipulações utilizando o teste com náuplios de *T. biminiensis*. Na coleta de Setembro, foram realizadas análises químicas de Hidrocarbonetos Aromáticos de Petróleo Dissolvidos e/ou Dispersos (HAPDDs), Nitrogênio Amoniacal Total (NAT), Agrotóxicos (175 compostos) e Metais (Al, As, Cd, Cu, Cr, Pb, Co, Sn, Fe, Mn, Hg, Ni, V e Zn) em cada ponto estudado. Análises de NAT e de metais também foram realizadas nas amostras de água e de *Ulva* sp. antes e após o tratamento com a macroalga. No P1.5, os possíveis agentes causadores da toxicidade em Abril foram oxidantes, material particulado, substâncias que degradadas/transformadas em pH ácido e básico, metais e/ou amônia e compostos orgânicos. No P3.8 do mesmo mês, os suspeitos foram oxidantes, compostos voláteis, material particulado, substâncias que degradadas/transformadas em pH básico, metais e/ou amônia e compostos orgânicos. Em Setembro, houve redução da toxicidade no P0 após todas as manipulações utilizadas, indicando a complexidade da caracterização deste ponto. O P1.5 teve como principais agentes suspeitos os oxidantes, metais e/ou amônia, compostos voláteis, material particulado, substâncias que podem ser degradadas/transformadas em pH ácido e básico e compostos orgânicos. Para o P3.8, houve redução em menor número de manipulações, sugerindo os compostos orgânicos, compostos voláteis e/ou surfactantes, metais e/ou amônia como os principais agentes tóxicos. As concentrações de HAPDDs nas amostras foram consideradas baixas, porém podendo causar efeitos tóxicos, sendo necessária uma análise quantitativa dos hidrocarbonetos presentes. Os metais detectados nas amostras foram Fe, Mn, Zn e V, sendo a concentração de Fe reduzida após a manipulação com a macroalga *Ulva* sp. em todas as amostras. Não foi possível detectar nas amostras nenhum dos 175 agrotóxicos analisados. Considerando os resultados ecotoxicológicos e os compostos analisados, sugere-se que os compostos orgânicos, os metais e a amônia seriam os principais agentes causadores da toxicidade das águas de Suape, sendo esta caracterização considerada bastante complexa. Trata-se de uma primeira tentativa de utilizar a técnica de AIT nas amostras ambientais de Suape e estes resultados servem como base para que novos trabalhos sejam realizados.

Palavras-chave: AIT, copépodo, água superficial, agentes tóxicos.

## 5.2 Introdução

Estudos ecotoxicológicos realizados no complexo estuarino de Suape indicam que a área apresenta contaminação moderada e bastante variável (FERNANDES, 1999; MENDONÇA, 2005; CPRH, 2006; ARAÚJO-CASTRO, 2008; ARAÚJO, 2008; OLIVEIRA, 2011; ARAÚJO e SOUZA-SANTOS, 2013; SOUZA-SANTOS e ARAÚJO, 2013; CAPÍTULO 2), embora ainda não tenha sido possível indicar qual substância estaria relacionada com a toxicidade verificada em amostras ambientais.

A diversidade de substâncias químicas lançadas nos sistemas hídricos é vasta e muitos contaminantes podem causar impactos ou danos irreversíveis aos ambientes aquáticos, dependendo da sua concentração. Quando as análises químicas e os ensaios ecotoxicológicos são realizados de forma independente apresentam valor limitado para determinação da causa da toxicidade em amostras ambientais. Isto se deve ao fato de que várias substâncias potencialmente tóxicas podem estar presentes no ambiente e indicar quais seriam as responsáveis pela toxicidade encontrada se torna uma tarefa difícil (PIRES, 2006).

O estudo de Avaliação e Identificação de Toxicidade ou AIT (do inglês: *Toxicity Identification Evaluation- TIE*) surge como uma importante ferramenta para indicar possíveis agentes ou classes de compostos causadores da toxicidade, pois consiste num conjunto de procedimentos que visam caracterizar e/ou identificar a toxicidade em amostras ambientais (BADARÓ-PEDROSO e RACHID, 2002; PHILLIPS et al., 2009).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA, do inglês: *United States Environmental Protection Agency*) inicialmente desenvolveu protocolos de AIT para amostras de efluentes industriais (U.S.EPA, 1991). Estudos posteriores demonstraram que estes procedimentos poderiam ser aplicados para identificação de compostos causadores da toxicidade em soluções de compostos diversos e em amostras ambientais, tais como água superficial, frações aquosas de sedimentos e sedimento integral (U.S.EPA, 1991; 1992; 1993a; 1993b, 1996, 2007). Em 1996, surgiu o protocolo específico para amostras de água marinha, onde foram realizadas algumas adaptações dos testes propostos nos guias anteriores (U.S.EPA, 1996).

O estudo de AIT é baseado na utilização conjunta de manipulações físicas e químicas das amostras seguidas de ensaios de toxicidade 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 sua remoção ou transformação (BADARÓ-PEDROSO e RACHID, 2002). Sendo assim, o estudo de AIT possibilita um progressivo estreitamento do foco diante da vasta gama de substâncias potencialmente tóxicas que podem estar presentes nas amostras ambientais.

Em geral, os testes de AIT se dividem em três fases que compreendem a caracterização, a identificação e a confirmação da toxicidade. A primeira etapa é chamada de fase de caracterização do AIT (fase I) e busca compreender as respostas de organismos às diferentes manipulações. Os resultados toxicológicos são comparados aos da amostra sem tratamento para observar se houve uma alteração da toxicidade (LAWS, 2000). Portanto, este conjunto de procedimentos tenta caracterizar a natureza físico-química do agente causador da toxicidade agrupando-os em classes ou categorias, como compostos orgânicos apolares, compostos oxidantes, metais, substâncias voláteis, etc. Desta forma, esta fase fornece informações primordiais que irão indicar os caminhos a serem tomados nas fases seguintes (COSTA et al., 2008).

Em continuidade ao estudo 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).

Estudos de AIT realizados demonstraram que esta técnica pode ser empregada de forma eficiente em diferentes amostras, quer seja, por exemplo, para avaliação de efluentes (DORN e RODGERS, 1989; BAILEY et al., 1995; BURGESS et al., 1995; SAUER et al., 1997; JIN et al., 1999; HONGXIA et al., 2003; HONGXIA et al., 2004; HOGAN et al., 2005; GRINEVICIUS, 2006; YI et. al., 2011; KANG et. al, 2011; FANG et al., 2012), de sedimento ou suas frações (BURGESS et al., 1993; CARR e NIPPER, 1999; CARR et al., 2001; HEINIS et al., 2004; KWOK et al., 2005; MACKEN et al., 2008; PHILLIPS et al., 2009; PICONE et al., 2009; ANDERSON et. al, 2010; PERRON et al., 2010; MEHLER et al., 2010; MONTERO et. al, 2013) e até mesmo de material particulado de rodovias (WATANABE et al., 2013). Entretanto, observa-se que ainda são escassos os estudos realizados em amostras

de água marinha e estuarina (BURGESS et al., 1993; THOMAS et al., 1999; GOLDING et al., 2006).

Apesar da crescente utilização da técnica de AIT em estudos ambientais, Phillips et al. (2009) relatam que a maior parte dos trabalhos realizados não tem obtido dados mais conclusivos devido à ausência da utilização de técnicas analíticas que podem resultar em informações mais completas acerca da toxicidade das amostras estudadas.

Alguns exemplos de aplicação do estudo de AIT em águas marinhas e estuarinas podem ser observados ao redor do mundo. Thomas et al. (1999) estudaram um estuário impactado por atividades industriais no Reino Unido, onde programas de monitoramento indicavam que a classe das substâncias orgânicas estavam envolvidas com a toxicidade presente nas amostras de água superficial e que as mesmas possuíam altas concentrações de compostos orgânicos. Partindo desta informação, os autores utilizaram o copépodo *Tisbe battagliai* no protocolo de AIT direcionado para esta classe de compostos e, após aplicação de diferentes técnicas de extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction- SPE*) e análises cromatográficas, identificaram alguns dos agentes tóxicos causadores da toxicidade, como os alquilfenóis, naftalenos e dimetil benzoquinona, entretanto, alguns compostos tóxicos permaneceram sem identificação.

Golding et al. (2006) desenvolveram o protocolo de TIE usando o teste com larvas de *Mimachlamys asperima*, um molusco bivalve australiano, para avaliar amostras de água coletadas em duas estações de um estuário situado numa área urbanizada de Sidney, Austrália. Durante o período seco, em duas estações, foi possível observar que a toxicidade estava associada com a presença de cobre, em ambas as amostras, e com amônia, apenas para uma das amostras.

No Brasil, a técnica de AIT vem sendo utilizada em estudos ecotoxicológicos realizados em universidades e centros de pesquisas, em sua grande maioria, da região Sudeste. Uma grande parte dos trabalhos avaliou amostras de efluentes industriais ou domésticos (BOHRER, 1993; BADARÓ-PEDROSO et al., 1998; BADARÓ-PEDROSO, 1999; BADARÓ-PEDROSO et al., 2000; PIRES e BOHRER-MOREL, 2000; RACHID, 2002; OLIVEIRA e BADARÓ-PEDROSO, 2004; PIRES, 2006; FURLEY, 2009; MELO et al., 2013), de sedimento ou frações (BOTTA-PASCHOAL e ROCHA, 2000; BOTTA-PASCHOAL, 2002; ARAÚJO et al., 2006; POLEZA, 2010; FERRAZ et al., 2013), e de água de rios ou de reservatórios (BURATINI et al., 2007; BARBOSA, 2010; MATOS, 2011). Em menor quantidade foram estudadas amostras de água estuarina ou marinha (BADARÓ-PEDROSO e BARROS, 2005). O trabalho de Nilin (2008) foi o primeiro trabalho de AIT a

ser realizado no Nordeste do Brasil, utilizando amostras de sedimento do estuário do Rio Ceará.

Ferraz (2013) utilizou o protocolo de AIT em água intersticial de sedimento da área afetada pelo Emissário Submarino de Santos (ESS) e de Bertioga em São Paulo – Brasil, empregando testes com os náuplios do copépodo *Nitocra* sp e com as larvas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Os resultados indicaram que a toxicidade aos náuplios foi causada provavelmente por sulfetos, amônia, substâncias orgânicas e/ou surfactantes e metais catiônicos. Para *L. variegatus*, apenas os sulfetos foram indicados como causadores da toxicidade no EES.

Considerando que o estudo de AIT pode indicar as possíveis causas da toxicidade em amostras ambientais e tendo em vista a importância da realização destes estudos no complexo estuarino de Suape, o objetivo deste trabalho foi empregar o estudo de AIT aliado ao teste de toxicidade com náuplios de *T. biminiensis* visando caracterizar e identificar os possíveis agentes causadores da toxicidade de amostras de água superficial da região e, desta forma, contribuir para o futuro estabelecimento das origens da toxicidade, das responsabilidades técnicas, das tomadas de decisão pelos órgãos competentes e, conseqüentemente, para a promoção da manutenção da qualidade dos ecossistemas aquáticos.

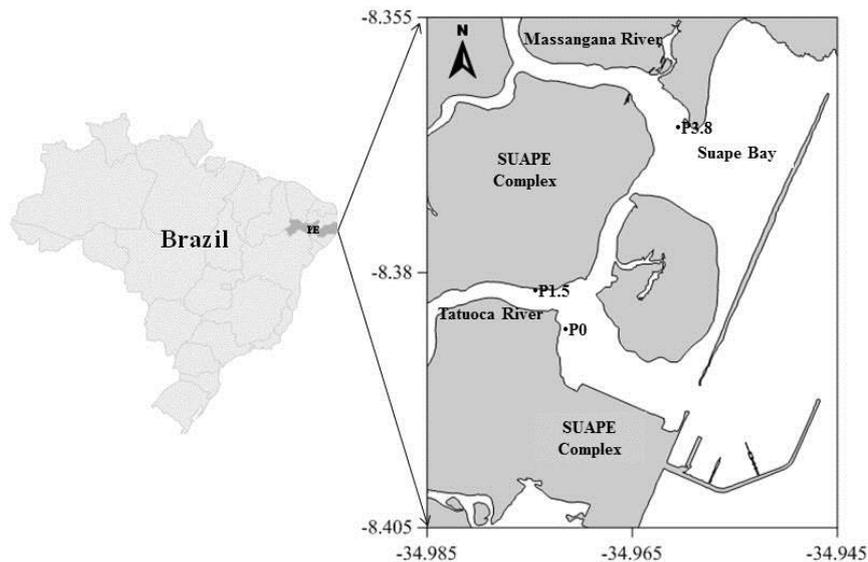
### 5.3 Material e Métodos

#### 5.3.1 Área de estudo, coleta e acondicionamento das amostras

A área de estudo, complexo estuarino de Suape, encontra-se descrita no capítulo 2. O estudo de AIT da fase I foi realizado em amostras coletadas em pontos localizados no rio Tatuoca, Massangana e na Baía de Suape nos meses de Abril e Setembro de 2013 (Figura 5.1). As amostras de água superficial foram coletadas durante a maré-baixa em garrafas plásticas de 120 mL (teste ecotoxicológico inicial) e em garrafões de 3L (estudo de caracterização) para cada ponto, sendo acondicionadas em caixas térmicas com gelo e transportadas até ao laboratório, onde foram mantidas em freezer a -20°C até a realização dos testes, por um período máximo de 60 dias de acordo com as orientações da CETESB (2011) e da NBR 15469 (ABNT, 2007). A salinidade, a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido das amostras foram aferidos *in locu* utilizando um refratômetro portátil, um termômetro digital, um pHmetro portátil e oxímetro, respectivamente. Antes da realização dos testes de toxicidade, as amostras foram descongeladas e, após atingirem temperatura ambiente (25°C), os parâmetros foram novamente aferidos, sendo incluída a estimativa da concentração de amônia não-ionizada (NH<sub>3</sub>) utilizando o kit de análise colorimétrica da amônia total da

LabconTest<sup>®</sup> para uso em amostras de água salgada de acordo com as indicações do fabricante. Para estimativa da concentração da amônia não-ionizada, a concentração da amônia total é relacionada com o pH e a temperatura da amostra.

Apenas as amostras coletadas em Setembro de 2013 foram submetidas às análises químicas. Foram coletados para cada ponto: 4 L de amostra em garrafas âmbar, em triplicata, com auxílio de uma base coletora para sustentação das garrafas na profundidade de 1 m (análise de hidrocarbonetos); 250 mL de amostra, em duplicata, em garrafas plásticas contendo 1 mL ácido nítrico concentrado (análise de metais); 4 L de amostra em garrafas âmbar (análise de agrotóxicos); 100 mL de amostra em garrafas plásticas, em duplicata (análise de nitrogênio amoniacal total). Após recolhimento de todas as amostras, os recipientes foram acondicionados em caixas térmicas e encaminhados imediatamente para análise, exceto as garrafas para análise de amônia que, chegando ao laboratório, foram filtradas e congeladas em freezer a -20°C até a realização da análise.



**Figura 5.1** – Distribuição dos pontos P0, P1.5 e P3.8 no complexo estuarino de Suape coletados em Abril e Setembro de 2013. Modificado de Araújo e Souza-Santos (2013).

### 5.3.2 Obtenção e cultivo dos copépodos e das microalgas

A obtenção e o cultivo dos copépodos seguiu o protocolo descrito no Capítulo 2.

### 5.3.3 Descrição do teste com náuplios

O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 2.

### 5.3.4 Observação dos estágios de desenvolvimento e do crescimento

Diante do grande número de tratamentos para cada amostra ambiental dos testes de AIT e da maior facilidade para obtenção desta medida, apenas o comprimento da cabeça foi obtido para cálculo dos parâmetros de comprimento médio da cabeça dos copepoditos e comprimento médio da cabeça por estágio. Também foi calculada a frequência dos estágios dos copepoditos. Os procedimentos foram realizados de acordo com o capítulo 2, mas o número de copepoditos medidos para obtenção destes dados foi de 10 indivíduos por réplica selecionados aleatoriamente, totalizando 40 indivíduos para cada amostra.

### 5.3.5 Avaliação e Identificação de Toxicidade – AIT

Os procedimentos do estudo de AIT foram realizados de acordo com os guias da U.S.EPA (U.S.EPA, 1991; 1993a; 1996). A temperatura ambiente do laboratório foi de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Visando garantir a aceitabilidade dos resultados, ao decorrer dos testes de toxicidade foram realizados procedimentos de controle paralelos aos ensaios: a) testes de toxicidade com náuplios em água do mar controle filtrada, b) teste com o controle das manipulações (água do mar filtrada controle sujeita à manipulação para verificar a ausência de toxicidade de cada manipulação ao organismo-teste, c) testes de sensibilidade com substância de referência conforme descrita no capítulo 2 e d) no início e ao final das manipulações foram verificados o pH, a salinidade, o oxigênio dissolvido e concentração de amônia tóxica ( $\text{NH}_3$  - não ionizada) das amostras.

A construção de cartas-controle para os resultados dos testes com a substância de referência considerou os dados obtidos no capítulo 1 (sete testes), 2 (cinco testes) e 3 (sete testes), totalizando 20 testes realizados com sucesso ao longo deste trabalho. Apenas o teste de referência durante um dos testes de sensibilidade dos náuplios aos reagentes do AIT não foi realizado, devido ao número insuficiente de náuplios obtidos.

#### 5.3.5.1 Sensibilidade dos náuplios do copépodo *T. biminiensis* aos reagentes do AIT

Antes de iniciar a fase I do AIT, foram realizados quatro ensaios para verificar a sensibilidade do organismo-teste ao sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ao tiosulfato de sódio. As soluções-estoque foram preparadas em água destilada ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) no dia anterior a realização dos testes e foram mantidas em geladeira até o uso. Os

organismos-teste foram expostos a quatro concentrações dentro da faixa de 100 a 2000 mg L<sup>-1</sup> para o EDTA e de 10 a 500 mg L<sup>-1</sup> para o tiosulfato de sódio, em quadruplicata para cada concentração. Após observação dos resultados, foram estabelecidas as CE, CL e CENO para estas substâncias, visando garantir a adequada realização das manipulações da AIT.

#### 5.3.5.2 Caracterização da toxicidade

Os procedimentos de AIT foram realizados no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia –LACE da UFPE com amostras cujas toxicidades foram previamente verificadas no teste ecotoxicológico com náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis*, teste de toxicidade inicial. As amostras foram submetidas a diferentes manipulações/tratamentos físicos e químicos para pesquisa do grupo ao qual pertence o composto tóxico de interesse (metais, oxidantes, compostos ácidos ou básicos, compostos orgânicos polares). Após os tratamentos foram realizados bioensaios empregando o mesmo organismo-teste e os resultados obtidos foram comparados ao da amostra não tratada (*Baseline*).

##### *Tratamento 1: EDTA*

Para verificar se a toxicidade da amostra estava relacionada à dissolução de metais foi realizada adição do EDTA para reduzir a toxicidade através da ligação aos cátions metálicos, tornando-as menos tóxicas. O EDTA se liga aos metais formando complexos metálicos, cujas forças da ligação dependerão do tipo de metal envolvido e do pH do meio. As soluções de EDTA (20.000 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas no dia anterior a realização dos testes de toxicidade e foram mantidas em geladeira até o uso. Foi adicionado gradativamente 125 µL da solução estoque para cada recipiente contendo 25 mL das amostras de forma a se obter uma concentração final de 100 mg L<sup>-1</sup>. Após um período de 3 horas, o bioensaio foi realizado.

##### *Tratamento 2: Tiosulfato de sódio*

Para verificar se a toxicidade da amostra estava relacionada a um agente oxidante, adicionou-se o tiosulfato de sódio como agente redutor para reagir com estes compostos e gerar as formas reduzidas que tendem a ser menos tóxicas (U.S.EPA, 1996). Estudos também associam o tiosulfato de sódio à quelação de metais catiônicos (HOCKETT e MOUNT, 1996; MATOS, 2011). No presente estudo, foi adicionado 18 µL da solução de tiosulfato de sódio (20.000 mg L<sup>-1</sup>, preparada no dia anterior ao teste) aos recipientes contendo 25 mL das amostras de forma a se obter concentração final de 15 mg L<sup>-1</sup>. Após um período de 1 hora, o bioensaio foi realizado.

### *Tratamento 3: Zeólitas*

As zeólitas são aluminosilicatos hidratados naturais ou sintéticos com estrutura cristalina utilizadas no tratamento de amostras contaminadas por amônia e/ou metais (U.S.EPA, 1991). Neste estudo, foram utilizadas separadamente zeólitas de duas marcas: Purina<sup>®</sup> e Multi<sup>®</sup>, esta última apenas para as amostras coletadas em Setembro de 2013. Foram pesados 12 g de zeólita para cada 120 mL da amostra. A zeólita foi previamente condicionada seguindo-se as seguintes etapas: a) pesagem e lavagem em água corrente, b) molho por 30 minutos em béquer contendo 120 mL de água ultra-pura, c) troca da água ultrapura por 120 mL de água do mar controle filtrada e molho por igual período, d) retirada da água com auxílio de peneira. Após condicionamento, 120 mL da amostra foram adicionados ao sistema que foi mantido por 30 minutos. Ao término do tratamento, a zeólita foi retirada das amostras para posterior realização do bioensaio.

### *Tratamento 4: Aeração*

A aeração pode alterar a toxicidade através dos mecanismos de volatilização, emulsão e oxidação das substâncias tóxicas presentes nas amostras. Algumas substâncias com estas características seriam o sulfeto de hidrogênio, a amônia e hidrocarbonetos voláteis (U.S.EPA, 1991; 1996). Foi utilizado um sistema de bombeamento de ar (composto por bomba de aeração, mangueiras acopladas com pipetas Pasteur) para que as amostras fossem submetidas à aeração moderada por 60 minutos. O pH foi monitorado durante o tratamento. Após este processo, seguiu-se o bioensaio.

### *Tratamento 5: Filtração*

Este tratamento serve para verificar se o agente tóxico passa através de um filtro ou se está associado ao material particulado. Foi realizada filtração das amostras através de membrana de fibra de vidro em kitassato acoplado a bomba de vácuo. Após este processo, seguiu-se o bioensaio.

### *Tratamento 6: Ajuste de pH*

A alteração do pH pode modificar significativamente a solubilidade, a volatilidade, a estabilidade e a especiação de um agente tóxico presente numa amostra, alterando sua composição química e a sua toxicidade e gerando informações importantes acerca do possível agente tóxico. As amostras foram ajustadas para pH 6 ( $\pm 0,2$ ) e pH 9,0 ( $\pm 0,2$ ) com a transferência de um volume conhecido de soluções de NaOH 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> ou HCl 0,1 e

1 mol L<sup>-1</sup>. A leitura do pH foi realizada em pHmetro de bancada devidamente calibrado. Durante o ajuste, o volume de 120 mL da amostra foi mantido sob agitação com bastão magnético em agitador magnético sem aquecimento até que a leitura se estabilizasse. No dia anterior ao teste, foram iniciados os ajustes de pH e a cada oito horas, o pH era monitorado e reajustado, se necessário, de acordo com o procedimento anteriormente descrito. Ao final de 24 horas, o pH das amostras foi reajustado para o pH inicial para dar início aos bioensaios. Para as amostras coletadas em setembro de 2013 também foi realizado um teste de ajuste de pH com duração de 1 hora para fins de comparação.

#### *Tratamento 7: Macroalga Ulva sp.*

A macrófita marinha *Ulva* sp. reduz a toxicidade causada por amônia e também pode retirar alguns metais presentes em matrizes aquosas (U.S.EPA, 1996). Para realização do estudo de AIT, as algas foram coletadas manualmente na praia de Boa Viagem (Recife-PE) um dia antes da realização dos testes e transportadas em caixas térmicas contendo a água do mar do próprio local. No laboratório, as algas foram lavadas e transferidas para baldes contendo água do mar controle filtrada na salinidade de 34±1‰, sendo submetidas a uma aeração suave e mantidas à temperatura de 20±1°C até a realização do teste no dia seguinte.

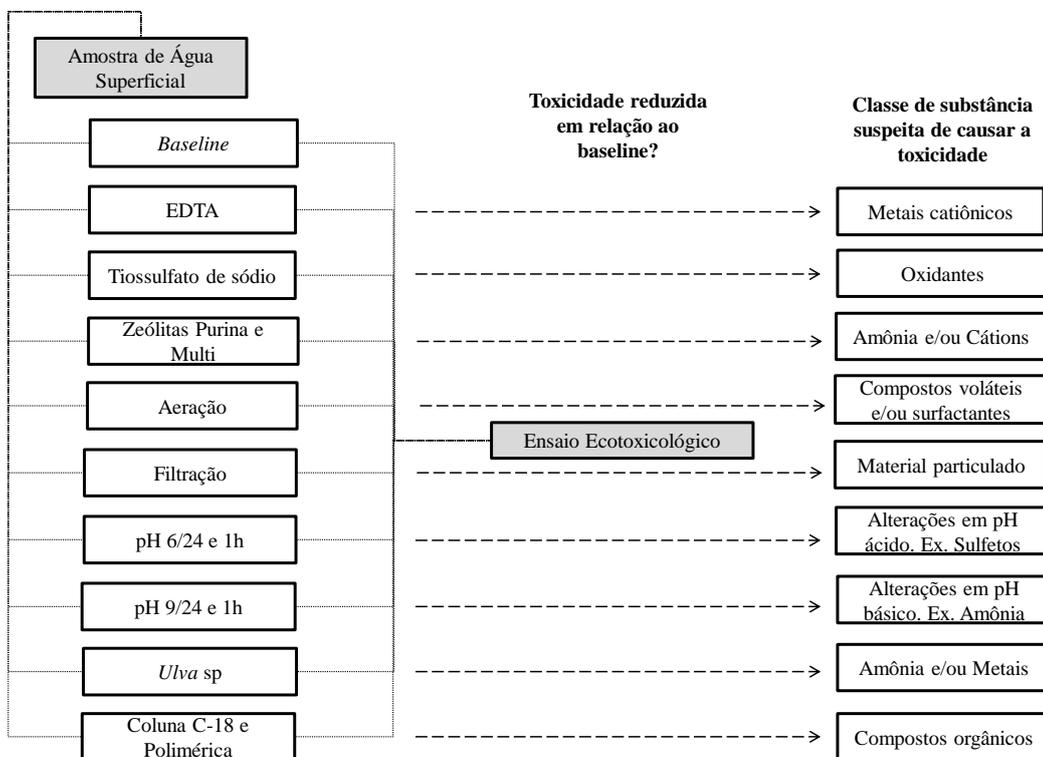
Para realização dos experimentos, as algas foram novamente lavadas e imediatamente secas suavemente em papel toalha. Para cada 120 mL das amostras foram pesados 12g de alga. O sistema foi mantido sob aeração suave. Após um período de 4 horas, as algas foram retiradas das amostras para posterior realização do bioensaio. As amostras de água e as algas utilizadas no teste de Setembro de 2013 foram analisadas em relação aos metais e ao Nitrogênio Amoniacal Total antes e após este tratamento.

#### *Tratamento 8: Extração em cartucho de fase sólida*

Neste procedimento foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction-SPE*) para extração de moléculas hidrofóbicas em matrizes aquosas, sendo esta técnica também conhecida por *clean up* ou limpeza da amostra. Ao passar pelo sorbente ou fase sólida contida na coluna ou cartucho, uma substância tóxica tem a opção de se ligar à sua superfície apolar. Se o agente tóxico é relativamente polar permanecerá na fase aquosa filtrada, enquanto que se for apolar, poderá ser retido pelo material do dispositivo, ou seja, devido a sua afinidade pelo sorbente será extraído da amostra. A ausência de toxicidade da amostra após sua passagem pela coluna sugere a presença de compostos orgânicos apolares neutros como responsáveis pela toxicidade (U.S.EPA, 1996).

Foram utilizados cartuchos de fase reversa de sílica C-18 (1000 mg/6mL, C18-E, Phenomenex<sup>®</sup>) e colunas com polímero de N-vinilpirrolidona (200 mg/3mL, Strata X, Phenomenex<sup>®</sup>). Os cartuchos foram acoplados em Manifold, sistema multivias que permitiu a utilização de até oito cartuchos por vez, possibilitando o tratamento de várias amostras simultaneamente. A coluna de sílica C18-E foi preparada seguindo-se as seguintes etapas: a) ativação da coluna com 12 ml de metanol P.A; b) passagem de 12 mL de água destilada; c) passagem de 150 mL de água do mar filtrada a ser utilizada como controle da coluna, descartando-se os primeiros 15 mL; d) passagem de 150 mL da amostra, descartando-se os primeiros 15 mL. A coluna polimérica foi preparada seguindo-se as mesmas etapas anteriores, modificando-se apenas: a) ativação da coluna com 6 ml de metanol P.A. e b) passagem de 6 mL de água destilada. Esta manipulação foi conduzida com as amostras filtradas para não sobrecarregar a coluna pela presença de material particulado e não atribuir o falso resultado de alteração da toxicidade causada pela retirada de compostos orgânicos quando na verdade seria pela retirada de material particulado.

Na figura 5.2 encontra-se um resumo esquemático geral da etapa de caracterização da toxicidade realizada neste trabalho.



**Figura 5.2-** Resumo esquemático dos procedimentos realizados no estudo de AIT nas amostras coletadas em Suape empregando o ensaio com náuplios de *T. biminiensis*.

### 5.3.6 Análises Químicas

Com base nos resultados dos bioensaios da fase I do AIT, foram conduzidas análises químicas para tentativa de identificação do agente causador da toxicidade das amostras. Conforme o protocolo da U.S.EPA (1993a), os procedimentos analíticos mais realizados são análise de metais, de compostos orgânicos não polares, de amônia e de surfactantes e cloro. No presente estudo, as amostras coletadas em Setembro de 2013 foram analisadas em relação à amônia, hidrocarbonetos, metais e agrotóxicos.

#### a) Amônia

A determinação de amônia das amostras de água antes e após o tratamento com a macroalga *Ulva* sp. foi realizada no Laboratório de Oceanografia Química – LOQUIM do Departamento de Oceanografia da UFPE. A amônia ou Nitrogênio Amoniacal Total – NAT ( $\text{N-NH}_3^- + \text{N-NH}_4^+$ ) foi determinada pelo método azul-indofenol (reação de Berthelot), segundo Grasshoff et al. (1983), com as amostras previamente filtradas em membrana de fibra de vidro.

#### b) Hidrocarbonetos Aromáticos de Petróleo Dissolvidos ou Dispersos–HAPDDs

Os HAPDDs foram analisados no Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos – OrganoMAR do Departamento de Oceanografia da UFPE. Imediatamente após a coleta, foi realizada extração das amostras com 20 mL de n-hexano. Os extratos foram secos e concentrados em evaporador rotativo, segundo Zanardi et al. (1999a e 1999b). A fluorescência das amostras foi medida em um espectrofluorímetro SpectraMax M3 (Molecular Devices) usando comprimento de onda de 310 nm para excitação e 360 nm para emissão. A quantificação da concentração total dos HAPDDs foi realizada através de uma curva analítica preparada com o padrão Criseno numa faixa de concentração de 0,01 a 2,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , assim os resultados da concentração total dos HAPDDs na água foram expressos em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de equivalentes do criseno (QUEVAUVILLER et al., 1992).

#### c) Metais

Os metais totais foram analisados nas amostras de água antes e após o tratamento com a macroalga *Ulva* sp. Também foram analisadas amostras de *Ulva* sp., antes e após contato com as amostras de água coletadas nos pontos. Estas análises foram realizadas pelo laboratório BIOAGRI. O preparo das amostras seguiu o guia da U.S.EPA (1992) e a determinação multielementar ocorreu seguindo o método APHA (2012) empregando a técnica

de Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry- ICP-MS*). A recuperação do método foi estimada em 96%. Foram analisados: Alumínio, Arsênio, Cadmio, Cobre, Cromo, Chumbo, Cobalto, Estanho, Ferro, Manganês, Mercúrio, Níquel, Vanádio e Zinco.

#### d) Agrotóxicos

Os agrotóxicos foram analisados pelo Laboratório de Agrotóxicos- LABTOX do Instituto de Tecnologia de Pernambuco-ITEP utilizando as técnicas de LC-MS/MS e GC-MS/MS segundo o método de análise multi-resíduo da U.S.EPA (1995). O Limite de Quantificação do método foi de 0,03 µg/L. Os 175 compostos analisados pertencem às classes de organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

#### 5.3.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov,  $\alpha = 0,05$ ) e homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett,  $\alpha = 0,05$ ). Após observação da inocuidade das manipulações para os náuplios de *T. biminiensis* (controle x controle de cada manipulação), foi verificada a redução da toxicidade das amostras ambientais pelas manipulações utilizadas. Ambas as comparações foram realizadas utilizando-se o teste t de Student ( $p \leq 0,05$ ). Para cada ponto foram realizadas comparações entre as manipulações considerando cada parâmetro ecotoxicológico estudado. Para dados que não apresentaram normalidade ou homocedasticidade, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney.

Para comparação da frequência dos estágios de desenvolvimento dos copepoditos de cada amostra em relação ao controle foi utilizado o teste de G ( $p \leq 0,05$ ), teste de qui-quadrado modificado por Williams (ZAR, 1996). Adicionalmente, foram utilizados os seguintes critérios: a) quando o número de copepoditos mais desenvolvidos (C3 e C4) nas manipulações foi superior ao *baseline*, foi indicada redução da toxicidade da amostra ( $\sum C3C4_{manipulação} \geq \sum C3C4_{baseline}$ ) e b) quando o número de copepoditos em estágios mais iniciais de desenvolvimento (C1 e C2) nas manipulações foi superior ao do *baseline* foi indicado o aumento da toxicidade da amostra ( $\sum C1C2_{manipulação} \geq \sum C1C2_{baseline}$ ).

A ANOVA seguida de teste de Dunnet foi utilizada para se identificar a concentração de efeito não observado (CENO) nos ensaios de sensibilidade dos organismos aos reagentes da AIT. Para cálculo da CE<sub>50</sub> e a CL<sub>50</sub> a partir dos resultados dos testes com a substância de referência foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977). As cartas-controle dos testes de sensibilidade foram construídas, considerando limites de  $\pm 2$  DP.

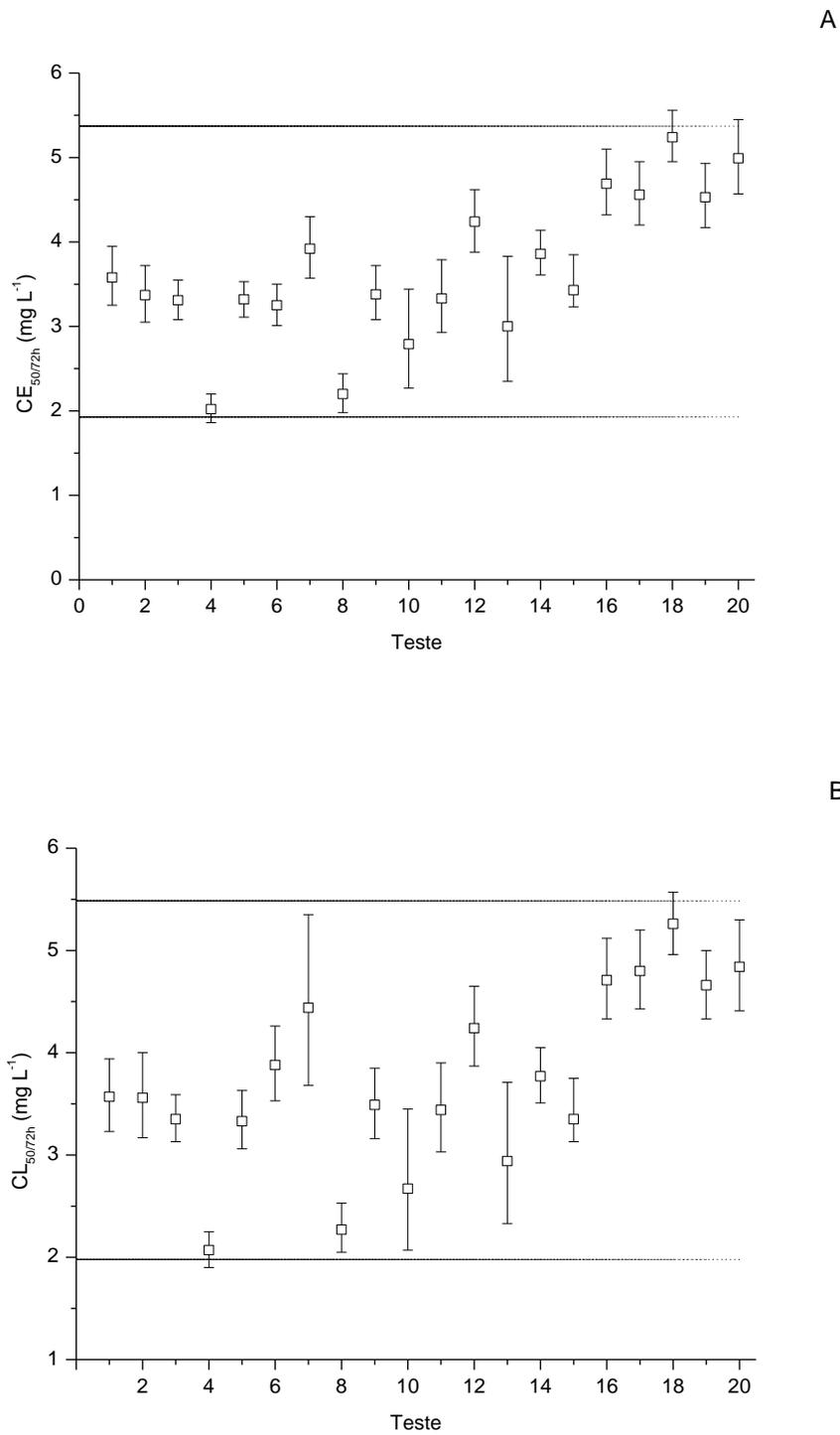
Os dados referentes aos pontos P0, P1.5 e P3.8 antes (*baseline*) e após o tratamento com a macroalga *Ulva* sp foram tratados, por possuírem dados mais completos acerca das análises químicas, com a Análise dos Componentes Principais (ACP) utilizando o programa Minitab versão 16. Foram utilizados os dados hidrológicos (pH, salinidade, amônia não-ionizada [kit colorimétrico] e oxigênio dissolvido), as médias das concentrações de metais (Al, Fe, Mn, Zn, V) e de NAT, assim como os resultados de mortalidade, desenvolvimento, inibição, comprimento médio da cabeça, comprimento da cabeça por estágio C2, C3 e C4.

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Sensibilidade à substância de referência

As cartas-controle construídas a partir dos resultados dos testes com o sulfato de zinco como substância de referência realizados nos capítulos 1 (Testes 1 a 7), 2 (Testes 8 a 12) e 3 (Testes 13 a 20) encontram-se na Figura 5.3. Considerando todos os 20 testes realizados, as médias de  $CE_{50-72h}$  e de  $CL_{50-72h}$  foram  $3,65 \pm 0,86 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3,73 \pm 0,88 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficientes de variação (CV) de 23,6% e 23,5%, respectivamente.

Considerando apenas os testes realizados paralelos ao estudo de AIT com as amostras ambientais (Testes 16 a 20), foi verificada a  $CE_{50-72h}$  de  $4,80 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$  e a  $CL_{50-72h}$  de  $4,85 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$ . Para a  $CE_{50-72h}$  e  $CL_{50-72h}$  foram obtidos CV de 6,35% e de 4,90%, respectivamente. Os CV das amostragens dos náuplios mantiveram-se abaixo de 10%. As cartas-controle dos testes de sensibilidade revelaram que todas as médias obtidas estavam dentro do limite de  $\pm 2 \text{ DP}$ , sendo os resultados considerados aceitáveis. Os valores do CV obtidos estavam dentro do critério de aceitação ( $CV \leq 30\%$ ) estabelecido para ensaios com substâncias de referências (EC, 1990).



**Figura 5.3-** Cartas-control com os valores de CE<sub>50</sub> (A) e CL<sub>50</sub> (B) obtidos para *T. biminiensis* nos 20 testes de exposição ao sulfato de zinco heptahidratado nos capítulos 1 (1 a 7), 2 (8 a 12) e 3 (13 a 20). Linhas pontilhadas indicam limites referentes a  $\pm 2$  DP.

#### 5.4.2 Sensibilidade dos náuplios do copépodo *T. biminiensis* aos reagentes do AIT

Os valores de  $CL_{50-72h}$ ,  $CE_{50-72h}$  e da CENO calculados a partir dos resultados obtidos nos quatro testes de sensibilidade ao EDTA e ao tiosulfato de sódio encontram-se na tabela 5.1. Foi definida a concentração final de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  para a manipulação com o EDTA, menor CENO obtida para este composto. Para o tiosulfato de sódio foi definida a concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , apesar de a menor CENO obtida ter sido de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , devido à obtenção e precisão na transferência deste volume.

**Tabela 5.1-** Concentrações de EDTA e de tiosulfato de sódio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) que afetaram/inibiram ou foram letais aos náuplios de *T. biminiensis*.

Teste	EDTA			Tiosulfato de sódio		
	$CE_{50-72h}$	CENO	$CL_{50-72h}$	$CE_{50-72h}$	CENO	$CL_{50-72h}$
1	710 (NC)	500	710 (NC)	90 (80-100)	$\leq 50$	90 (80-90)
2	220 (NC)	100	230 (220-240)	70 (70-80)	$\leq 50$	70 (70-80)
3	300 (NC)	200	300 (NC)	80 (70-100)	10	80 (70-100)
4	320 (310-320)	200	320 (310-320)	50 (40-60)	10	50 (50-60)
<i>Média</i>	<b><math>387 \pm 219</math></b>		<b><math>390 \pm 216</math></b>	<b><math>72 \pm 17</math></b>		<b><math>72 \pm 17</math></b>

NC: Intervalo não calculado pelo programa utilizado.

#### 5.4.3 Parâmetros físico-químicos antes e após as manipulações de AIT

Os resultados das análises físico-químicas (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e amônia) da amostra ambiental bruta, do *baseline* (após ajuste de salinidade e sem as manipulações) e após às manipulações encontram-se nas tabelas 5.2 e 5.3. Os valores obtidos permaneceram de acordo com as indicações de Ribeiro e Souza-Santos (2011), garantindo a ausência de interferência destes parâmetros sobre os resultados obtidos no estudo de AIT. A análise da amônia total através do kit colorimétrico indicou que todas as amostras e referidas manipulações apresentaram concentrações iguais ou inferiores a  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir destes resultados as concentrações de amônia não-ionizada foram estimadas (Tabelas 5.2 e 5.3). Em Setembro, observou-se que as amostras *baseline* do P0 e do P1.5 apresentaram níveis de amônia não-ionizada ligeiramente acima da concentração de segurança ( $\leq 0,018 \text{ mg L}^{-1}$ ) indicada pelo fabricante do kit de análise colorimétrica

**Tabela 5.2-** Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de Abril de 2013 da amostra ambiental bruta, *baseline* (após ajuste de salinidade e sem as manipulações) e após as manipulações da fase I do estudo de AIT.

Manipulação	P1.5				P3.8			
	O.D.	pH	Sal.	NH <sub>3</sub>	O.D.	pH	Sal.	NH <sub>3</sub>
Amostra Bruta	7,68	7,74	39	0,011	7,56	7,65	31	0,007
<i>Baseline</i> (após ajuste)	7,58	7,68	34	0,007	7,61	7,80	31	0,009
EDTA	7,44	7,60	34	0,007	7,41	7,54	31	0,007
Tiosulfato de sódio	7,51	7,71	34	0,011	7,48	7,69	31	0,007
<i>Ulva</i> sp.	7,20	7,64	33	0,007	7,17	7,71	31	0,009
Aeração	7,28	7,65	34	0,007	7,26	7,76	31	0,009
Filtração	7,34	7,68	34	0,007	7,28	7,81	30	0,009
Coluna C-18	7,75	7,66	33	0,007	7,68	7,70	30	0,007
Coluna Polimérica	7,17	7,61	32	0,007	7,63	7,74	30	0,007
Zeólita Purina	7,33	7,72	34	0,011	7,46	7,78	31	0,009
pH 6 / 24 h	7,06	7,59	33	0,007	7,12	7,66	30	0,007
pH 9 / 24 h	7,55	7,62	32	0,007	7,88	7,68	30	0,007

Oxigênio dissolvido (OD) em mg L<sup>-1</sup>, pH, salinidade (Sal.) e amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) em mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.3-** Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de Setembro de 2013 da amostra ambiental bruta, *baseline* (após ajuste de salinidade e sem as manipulações) e após as manipulações da fase I do estudo de AIT.

Manipulação	P0				P1.5				P3.8			
	O.D.	pH	Sal.	NH <sub>3</sub>	O.D.	pH	Sal.	NH <sub>3</sub>	O.D.	pH	Sal.	NH <sub>3</sub>
Amostra Bruta	6,95	8,24	36	0,025	7,68	8,18	31	0,025	7,56	7,89	30	0,016
<i>Baseline</i> (após ajuste)	*	*	*	*	7,75	8,13	34	0,025	7,10	8,08	34	0,016
EDTA	6,75	8,08	35	0,016	6,64	8,06	33	0,016	6,75	7,78	34	0,011
Tiosulfato de sódio	6,84	7,93	35	0,016	6,56	8,19	33	0,025	6,80	7,86	34	0,011
<i>Ulva</i> sp.	5,82	7,78	36	0,011	6,10	7,80	33	0,016	6,42	8,10	35	0,016
Aeração	6,77	8,13	36	0,025	7,73	7,92	34	0,016	7,09	7,60	35	0,007
Filtração	6,82	8,13	36	0,025	6,61	8,27	33	0,025	6,40	7,63	34	0,007
Coluna C-18	6,20	8,19	35	0,025	6,62	8,24	32	0,025	7,22	7,76	33	0,011
Coluna Polimérica	6,65	8,29	35	0,025	6,67	8,17	32	0,025	7,18	7,73	33	0,011
Zeólita Purina	6,76	8,02	35	0,016	7,84	7,95	33	0,016	7,52	7,92	35	0,016
Zeólita Multi	6,68	8,22	36	0,025	7,95	7,99	33	0,016	7,54	7,88	34	0,016
pH 6 / 24 h	6,58	8,26	36	0,025	7,29	8,09	33	0,016	7,16	7,84	34	0,016
pH 9 / 24 h	6,86	8,32	36	0,025	6,90	8,20	33	0,016	7,09	7,88	34	0,016
pH 6 / 1 h	6,66	8,22	36	0,025	7,53	7,91	33	0,016	7,40	7,86	35	0,016
pH 9 / 1 h	6,98	8,11	35	0,016	7,67	8,10	33	0,016	7,27	7,87	35	0,016

\* *Baseline* com a amostra bruta sem ajustes. Oxigênio dissolvido (OD) em mg L<sup>-1</sup>, pH, salinidade (Sal.) e amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) em mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.4.4 Caracterização da toxicidade da água superficial de Suape

Os parâmetros ecotoxicológicos forneceram diferentes resultados quanto à indicação dos agentes tóxicos das amostras coletadas em Abril e Setembro de 2013 (Tabelas 5.4 a 5.9).

##### 5.4.4.1 Desenvolvimento, Inibição e Mortalidade (%)

No mês de Abril de 2013 (Tabelas 5.4), a análise estatística do parâmetro de mortalidade indicou que houve redução do efeito letal do ponto P1.5 após a manipulação com a Coluna Polimérica e do P3.8 após as manipulações de Aeração, Filtração, *Ulva* sp. e Coluna Polimérica. O parâmetro de desenvolvimento não evidenciou redução da toxicidade para nenhuma das amostras coletadas em Abril de 2013. Já o de inibição forneceu resposta idêntica ao parâmetro de mortalidade. Dentre as manipulações, foi verificada toxicidade apenas do Tiossulfato de Sódio aos náuplios expostos à amostra do P1.5 ( $t=-5.2439$ ;  $p=0,0019$ ) e à água do mar controle ( $t=-5.769$ ;  $p=0,0012$ ), considerando a inibição e a mortalidade, sendo as demais manipulações consideradas inócuas.

Em Setembro de 2013 (Tabelas 6.5), houve redução da toxicidade, considerando o parâmetro de mortalidade: do ponto P0 após as manipulações de Zeólita Purina, Zeólita Multi, Aeração, Filtração, pH6/1h, pH9/1h, *Ulva* sp. e Coluna C-18; do ponto P1.5 após os tratamentos de Tiossulfato de sódio, Zeólita Multi, Aeração, Filtração, pH6/24h, pH6/1h, Coluna Polimérica e Coluna C-18; do ponto P3.8 após a Coluna Polimérica. Para o parâmetro de desenvolvimento, o ponto P0 apresentou redução da toxicidade após todas as manipulações utilizadas, no entanto, apesar da diferença estatística significativa observada, os resultados não são biologicamente significativos uma vez que o percentual de desenvolvimento do *baseline* foi de  $94.3 \pm 1,5\%$ . Para inibição, os resultados obtidos para o ponto P0 foram similares aos do parâmetro de mortalidade adicionando-se a manipulação de pH9/24h. Similarmente, para o P1.5 houve redução da toxicidade nas mesmas manipulações para inibição e mortalidade, adicionando-se a esta última a manipulação de pH9/1h. Para o ponto P3.8, os parâmetros de inibição e mortalidade forneceram respostas idênticas. Todas as manipulações foram consideradas inócuas ao controle e às amostras ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 5.4-** Médias ( $\pm$ SD) dos percentuais de mortalidade, desenvolvimento e inibição dos náuplios de *T. biminiensis* obtidas nas manipulações do estudo de AIT com amostras de água superficial de Suape coletadas em Abril de 2013.

Parâmetro	Mortalidade (%)		Desenvolvimento (%)		Inibição (%)	
	P1.5	P3.8	P1.5	P3.8	P1.5	P3.8
Baseline I	24,2 $\pm$ 5,7	42,0 $\pm$ 13,4	98,5 $\pm$ 2,1	98,0 $\pm$ 1,7	25,4 $\pm$ 4,9	43,2 $\pm$ 13,2
EDTA	19,9 $\pm$ 6,6	27,4 $\pm$ 8,2	98,1 $\pm$ 2,9	98,3 $\pm$ 1,6	21,3 $\pm$ 8,1	28,6 $\pm$ 8,6
Tiosulfato de sódio	55,1 $\pm$ 9,5**	44,9 $\pm$ 7,9	97,6 $\pm$ 3,1	99,4 $\pm$ 1,3	56,0 $\pm$ 10,6**	45,2 $\pm$ 8,4
Zeólita Purina	28,8 $\pm$ 10,2	30,4 $\pm$ 7,7	98,4 $\pm$ 1,2	98,7 $\pm$ 0,9	29,2 $\pm$ 9,8	31,2 $\pm$ 7,7
Aeração	23,1 $\pm$ 6,4	<b>20,2 <math>\pm</math> 6,8*</b>	98,5 $\pm$ 1,1	98,5 $\pm$ 1,1	24,2 $\pm$ 5,6	<b>21,3 <math>\pm</math> 6,8*</b>
Filtração	21,9 $\pm$ 15,5	<b>18,1 <math>\pm</math> 7,8*</b>	97,4 $\pm$ 0,6	97,0 $\pm$ 3,0	24,0 $\pm$ 15,1	<b>20,7 <math>\pm</math> 5,8*</b>
Baseline II	27,5 $\pm$ 4,4	30,1 $\pm$ 1,1	99,2 $\pm$ 1,0	98,0 $\pm$ 0,8	28,1 $\pm$ 5,0	31,5 $\pm$ 0,9
pH 6 24h	29,2 $\pm$ 2,9	26,9 $\pm$ 2,0	98,8 $\pm$ 0,8	95,8 $\pm$ 7,5	30,1 $\pm$ 3,4	30,1 $\pm$ 4,8
pH 9 24h	38,1 $\pm$ 12,4	15,3 $\pm$ 21,7	98,7 $\pm$ 1,6	99,4 $\pm$ 0,7	38,9 $\pm$ 11,9	15,6 $\pm$ 14,0
<i>Ulva</i> sp.	17,0 $\pm$ 14,3	<b>9,5 <math>\pm</math> 6,6*</b>	99,0 $\pm$ 1,4	99,7 $\pm$ 0,6	17,8 $\pm$ 14,3	<b>9,8 <math>\pm</math> 6,1*</b>
Coluna Polimérica	<b>10,6 <math>\pm</math> 4,6*</b>	<b>7,5 <math>\pm</math> 2,0*</b>	99,6 $\pm$ 0,7	99,2 $\pm$ 1,4	<b>11,0 <math>\pm</math> 4,1*</b>	<b>8,3 <math>\pm</math> 0,7*</b>
Coluna C18	15,6 $\pm$ 15,1	24,9 $\pm$ 9,9	96,0 $\pm$ 2,5	98,3 $\pm$ 1,5	18,4 $\pm$ 18,0	26,1 $\pm$ 10,8

(\*negrito): Diferença significativa entre o resultado do tratamento e do *baseline* correspondente usando o Teste t ( $p \leq 0,05$ ) indicando que o tratamento acarretou redução de toxicidade à amostra.

(\*\*): Diferença significativa entre o resultado do tratamento e do *baseline* correspondente usando o Teste t ( $p \leq 0,05$ ), indicando que o tratamento acarretou aumento de toxicidade à amostra.

**Tabela 5.5-** Médias ( $\pm$ SD) dos percentuais de mortalidade, desenvolvimento e inibição dos náuplios de *T. biminiensis* obtidas nas manipulações do estudo de AIT com amostras de água superficial de Suape coletadas em Setembro de 2013.

Parâmetro	Mortalidade (%)			Desenvolvimento (%)			Inibição (%)		
	P0	P1.5	P3.8	P0	P1.5	P3.8	P0	P1.5	P3.8
Baseline	18,0 $\pm$ 4,8	16,1 $\pm$ 2,9	29,5 $\pm$ 7,5	94,3 $\pm$ 1,5	94,6 $\pm$ 0,8	96,6 $\pm$ 1,7	22,8 $\pm$ 4,1	20,6 $\pm$ 2,4	31,9 $\pm$ 7,1
EDTA	13,6 $\pm$ 9,8	15,9 $\pm$ 8,5	34,7 $\pm$ 9,9	<b>97,2 <math>\pm</math> 1,8*</b>	94,5 $\pm$ 2,2	95,5 $\pm$ 1,7	14,9 $\pm$ 10,8	20,6 $\pm$ 6,3	37,7 $\pm$ 8,9
Tiosulfato de sódio	24,2 $\pm$ 13,5	<b>7,8 <math>\pm</math> 4,2*</b>	29,5 $\pm$ 5,5	<b>98 <math>\pm</math> 1,6*</b>	95,2 $\pm$ 1,0	90,8 $\pm$ 5,4	25,2 $\pm$ 13,4	12,2 $\pm$ 4,0	35,8 $\pm$ 8,2
Zeólita Purina	<b>6,7 <math>\pm</math> 4,3*</b>	8,7 $\pm$ 6,6	29,7 $\pm$ 9,6	<b>97,1 <math>\pm</math> 1,6*</b>	94,5 $\pm$ 0,6	97,5 $\pm$ 1,1	<b>9,4 <math>\pm</math> 4,0*</b>	13,6 $\pm$ 5,7	31,3 $\pm$ 9,9
Zeólita Multi	<b>5,1 <math>\pm</math> 2,4*</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 3,9*</b>	20,7 $\pm$ 9,2	<b>98,7 <math>\pm</math> 0,5*</b>	95,2 $\pm$ 1,4	96,0 $\pm$ 0,8	<b>6,3 <math>\pm</math> 2,3*</b>	<b>9,1 <math>\pm</math> 6,3*</b>	26,7 $\pm$ 6,8
Aeração	<b>5,1 <math>\pm</math> 4,7*</b>	<b>6,8 <math>\pm</math> 6,9*</b>	21,1 $\pm$ 13,4	<b>98,1 <math>\pm</math> 1,0*</b>	94,0 $\pm$ 1,9	95,1 $\pm$ 1,9	<b>6,9 <math>\pm</math> 4,0*</b>	<b>12,4 <math>\pm</math> 5,8*</b>	25,0 $\pm$ 12,2
Filtração	<b>5,4 <math>\pm</math> 5,2*</b>	<b>5,2 <math>\pm</math> 4,4*</b>	18,8 $\pm$ 12,8	<b>97,4 <math>\pm</math> 1,5*</b>	94,8 $\pm$ 0,6	93,7 $\pm$ 1,4	<b>7,1 <math>\pm</math> 6,1*</b>	<b>9,9 <math>\pm</math> 4,4*</b>	22,8 $\pm$ 14,5
pH 6 24h	29,0 $\pm$ 7,6	<b>11,0 <math>\pm</math> 2,2*</b>	21,6 $\pm$ 9,8	<b>97,4 <math>\pm</math> 1,2*</b>	93,5 $\pm$ 2,3	96,6 $\pm$ 2,2	30,8 $\pm$ 7,6	<b>16,8 <math>\pm</math> 1,0*</b>	24,4 $\pm$ 7,6
pH 9 24h	11,2 $\pm$ 4,7	13,9 $\pm$ 11,1	24,8 $\pm$ 17,5	<b>98,4 <math>\pm</math> 0,8*</b>	89,1 $\pm$ 7,0	96,3 $\pm$ 1,2	<b>12,7 <math>\pm</math> 4,4*</b>	23,2 $\pm$ 12,3	27,2 $\pm$ 18,1
pH 6 1h	<b>5,8 <math>\pm</math> 6,0*</b>	<b>4,9 <math>\pm</math> 4,8*</b>	30,2 $\pm$ 9,6	<b>98,1 <math>\pm</math> 1,1*</b>	<b>96,1 <math>\pm</math> 0,3*</b>	94,8 $\pm$ 2,4	<b>1,0 <math>\pm</math> 1,0*</b>	<b>8,6 <math>\pm</math> 4,4*</b>	33,8 $\pm$ 9,7
pH 9 1h	<b>3,6 <math>\pm</math> 3,4*</b>	7,7 $\pm$ 6,6	25,2 $\pm$ 11,4	<b>98,7 <math>\pm</math> 1,1*</b>	<b>96,9 <math>\pm</math> 1,6*</b>	93,3 $\pm$ 2,2	<b>4,9 <math>\pm</math> 2,7*</b>	<b>9,9 <math>\pm</math> 6,6*</b>	30,0 $\pm$ 11,7
<i>Ulva</i> sp.	<b>6,0 <math>\pm</math> 5,5*</b>	16,3 $\pm$ 6,1	29,7 $\pm$ 7,6	<b>98,8 <math>\pm</math> 0,9*</b>	96,7 $\pm$ 1,8	95,3 $\pm$ 2,7	<b>6,6 <math>\pm</math> 5,6*</b>	19,8 $\pm$ 7,1	32,8 $\pm$ 8,9
Coluna Polimérica	17,0 $\pm$ 7,4	<b>3,3 <math>\pm</math> 3,8*</b>	<b>14,9 <math>\pm</math> 8,1*</b>	<b>99,5 <math>\pm</math> 1,0*</b>	95,4 $\pm$ 2,9	93,2 $\pm$ 2,3	17,4 $\pm$ 7,3	<b>6,4 <math>\pm</math> 6,9*</b>	<b>20,7 <math>\pm</math> 8,2*</b>
Coluna C18	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,2*</b>	<b>3,6 <math>\pm</math> 7,0*</b>	22,9 $\pm$ 6,0	<b>97,7 <math>\pm</math> 1,8*</b>	95,3 $\pm$ 0,8	94,9 $\pm$ 3,2	<b>2,0 <math>\pm</math> 1,5*</b>	<b>6,7 <math>\pm</math> 8,0*</b>	26,9 $\pm$ 6,1

(\* negrito): Diferença significativa entre o resultado do tratamento e do *baseline* correspondente usando o Teste t ( $p \leq 0,05$ ) indicando que o tratamento acarretou redução de toxicidade à amostra.

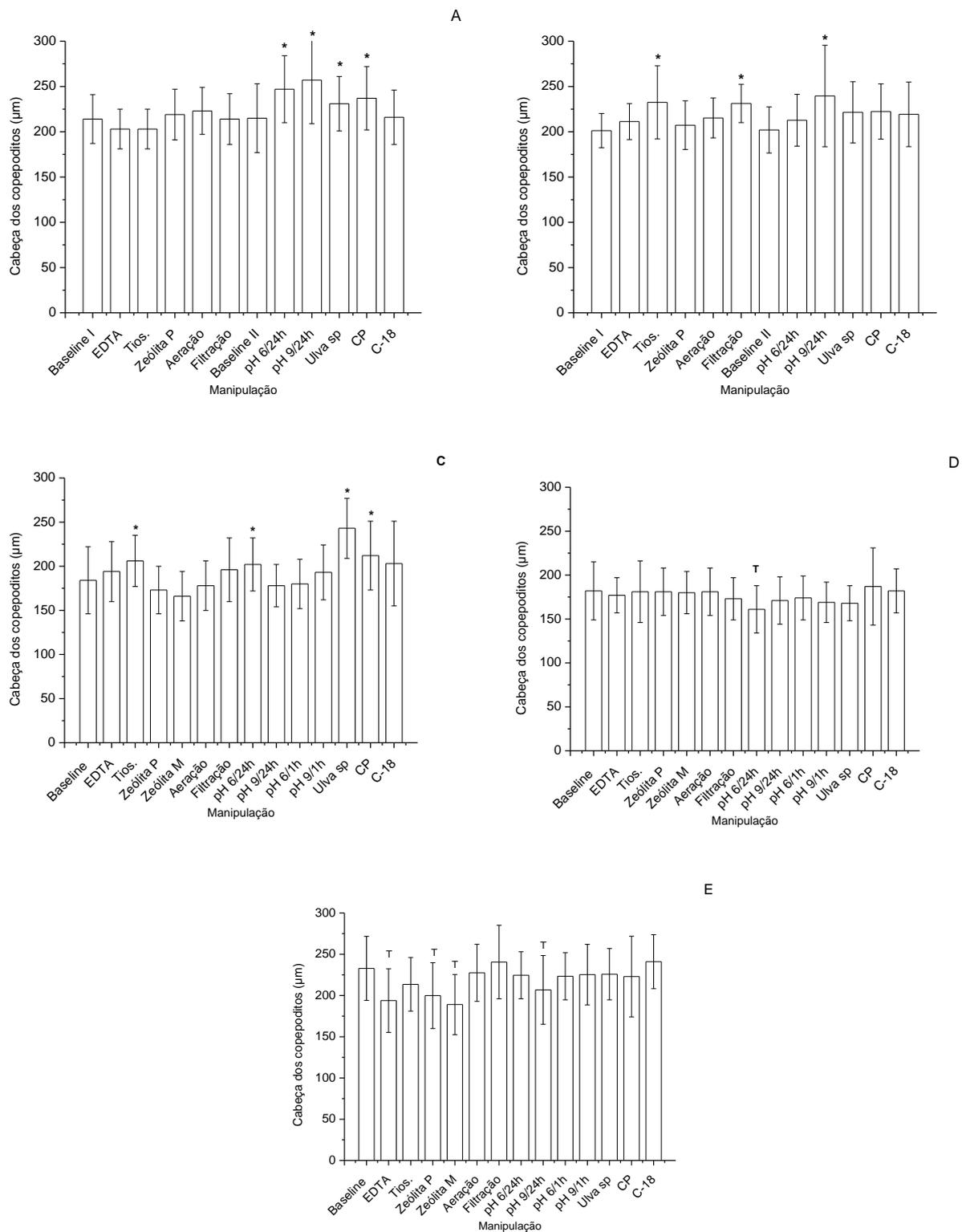
(\*\*): Diferença significativa entre o resultado do tratamento e do *baseline* correspondente usando o Teste t ( $p \leq 0,05$ ), indicando que o tratamento acarretou aumento de toxicidade à amostra.

#### 5.4.4.2 Comprimento da cabeça dos copepoditos geral e por estágio

Em Abril de 2103 (Figura 5.4A), levando em conta o comprimento médio da cabeça dos copepoditos, o ponto P1.5 aumentou significativamente após aplicação das manipulações sugerindo que houve uma redução da toxicidade em pH 6/24h, pH9/24h, *Ulva* sp. e Coluna Polimérica. Para o ponto P3.8, este parâmetro aumentou significativamente após aplicação das manipulações com Tiosulfato de sódio, Filtração e pH9/ 24h (Figura 5.4B). Nenhuma manipulação apresentou-se tóxica considerando este parâmetro.

Em Setembro de 2013, para o P0, a toxicidade foi reduzida após as manipulações com Tiosulfato de sódio, pH6/24h, *Ulva* sp. e Coluna Polimérica (Figura 5.4C). Para o P1.5 e P3.8, nenhuma manipulação reduziu a toxicidade (Figura 5.4D e E). Foi observado aumento da toxicidade devido à manipulação no P1.5 após a manipulação com pH 6/24h e no P3.8 após as manipulações com EDTA, Zeólita Purina, Zeólita Multi e pH 9/24h, uma vez que foi observada diminuição do tamanho da cabeça nestas manipulações quando comparadas ao do *baseline*.

O comprimento da cabeça dos copepoditos por estágio em Abril (Tabela 5.6) revelou que no ponto P1.5 para o estágio C4 e na manipulação pH 9/24h foi maior que no *baseline* indicando redução de toxicidade. Desta forma, com a utilização deste parâmetro, foi possível observar apenas uma manipulação como redutora da toxicidade, diferente do comprimento médio da cabeça de todos os copepoditos em geral, onde quatro manipulações foram indicadas (pH6/24h, pH9/24h, *Ulva* sp., Coluna Polimérica). Para o P3.8, também só foi possível observar diferenças significativas do tamanho da cabeça no estágio C4, sendo obtido o mesmo padrão de resposta observado para os copepoditos em geral, ou seja, redução da toxicidade após as manipulações com Tiosulfato de sódio, Filtração e pH9/24h. Observou-se que para o P1.5 as manipulações com EDTA, Filtração e Coluna C-18 apresentaram toxicidade, menor comprimento da cabeça por estágio comparado ao do *baseline*, para alguns estágios de copepoditos. Apenas a manipulação com a Coluna C-18 apresentou toxicidade para os copepoditos em estágio C2 expostos às amostras do P3.8.



**Figura 5.4-** Comprimento médio das cabeças dos copepoditos antes e após as manipulações das amostras coletadas em Suape em Abril, (A) P1.5 e (B) P3.8, e em Setembro de 2103, (C) P0 (D) P1.5 e (E) P3.8. (\*) Indica diferença redução significativa da toxicidade, (T) indica aumento significativo de toxicidade em relação ao *baseline*, teste t ( $p \leq 0,05$ ).

Em Setembro (Tabela 5.7), foi possível observar redução da toxicidade do P0 após algumas manipulações através do parâmetro de comprimento da cabeça nos estágios C2 (EDTA, Tiossulfato, Zeólita Purina, Filtração, pH6/24h, pH6/1h, pH9/1h e Coluna C18), C3 (*Ulva* sp.) e C4 (Coluna C-18). Observa-se que foi obtido maior número de manipulações eficientes na redução da toxicidade para o comprimento da cabeça por estágio do que para o comprimento médio da cabeça dos copepoditos em geral. Para o P1.5, apenas o comprimento da cabeça no estágio de C3 indicou redução da toxicidade nas manipulações com EDTA, Tiossulfato, Zeólita Purina, Zeólita Multi, pH6/24h, pH6/1h, Colunas Polimérica e C18. Para esta amostra também se observa que este parâmetro foi mais sensível que o comprimento da cabeça de copepoditos em geral, para o qual não foi possível observar redução da toxicidade em nenhuma manipulação. O P3.8 teve sua toxicidade reduzida apenas após a manipulação de aeração, considerando o estágio de C2. Mais uma vez se constata a diferença na resposta quanto aos copepoditos em geral, para os quais nenhuma manipulação causou redução da toxicidade da amostra.

Em relação à toxicidade das manipulações, a manipulação pH9/24h causou aumento de toxicidade para os copepoditos em estágio C2 expostos ao P0. Nenhuma manipulação acarretou toxicidade aos náuplios expostos ao P1.5 e as manipulações com EDTA (C2 e C4), Tiossulfato de sódio (C3), Zeólita Multi (C2 e C4) e pH9/24h (C2, C3 e C4) foram tóxicas para alguns estágios de copepoditos que apresentaram comprimento da cabeça reduzido quando comparado ao do *baseline*.

**Tabela 5.6-** Médias ( $\pm$ SD) do comprimento da cabeça ( $\mu$ m) por estágio de copepoditos de *T. biminiensis* observados ao final das manipulações do estudo de AIT com as amostras de água superficial coletadas em Suape em Abril de 2013.

<i>Ponto</i>	<i>P1.5</i>				<i>P3.8</i>			
	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>
<i>Baseline I</i>	150 #	180 $\pm$ 1	206 $\pm$ 11	241 $\pm$ 24	-	168 $\pm$ 5	198 $\pm$ 10	222 $\pm$ 16
EDTA	160 #	176 $\pm$ 9	203 $\pm$ 9	221 $\pm$ 17**	-	175 $\pm$ 21	203 $\pm$ 9	229 $\pm$ 18
Tiosulfato de sódio	-	170 $\pm$ 10	202 $\pm$ 13	237 $\pm$ 21	-	-	198 $\pm$ 11	<b>251 <math>\pm</math> 38*</b>
Zeólita Purina	-	-	202 $\pm$ 21	241 $\pm$ 12	-	155 $\pm$ 7	194 $\pm$ 15	237 $\pm$ 9
Aeração	150 #	175 $\pm$ 10	205 $\pm$ 6	238 $\pm$ 17	160 #	190 $\pm$ 1	201 $\pm$ 5	231 $\pm$ 17
Filtração	-	-	185 $\pm$ 17**	223 $\pm$ 12**	-	170 #	203 $\pm$ 5	<b>241 <math>\pm</math> 12*</b>
<i>Baseline II</i>	153 $\pm$ 6	180 $\pm$ 11	200 $\pm$ 14	238 $\pm$ 32	-	175 $\pm$ 8	196 $\pm$ 7	226 $\pm$ 23
pH 6 24h	-	-	207 $\pm$ 15	257 $\pm$ 33	160 #	177 $\pm$ 10	198 $\pm$ 8	237 $\pm$ 15
pH 9 24h	-	200 #	203 $\pm$ 15	<b>286 <math>\pm</math> 31*</b>	150 #	160 #	195 $\pm$ 15	<b>284 <math>\pm</math> 38*</b>
<i>Ulva</i> sp.	-	160 #	205 $\pm$ 8	242 $\pm$ 27	150 #	178 $\pm$ 4	197 $\pm$ 7	244 $\pm$ 22
Coluna Polimérica	-	180 #	193 $\pm$ 6	245 $\pm$ 32	-	170 $\pm$ 17	202 $\pm$ 4	236 $\pm$ 24
Coluna C18	-	160 $\pm$ 8**	194 $\pm$ 5	227 $\pm$ 23	-	145 $\pm$ 7**	190 $\pm$ 9	233 $\pm$ 30

(\*) Diferença estatística significativa Teste t ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*); Tratamento acarretou toxicidade à amostra;

(#) Apenas um indivíduo, não entrou na análise estatística; (-) Não apresentou o estágio.

**Tabela 5.7-** Médias ( $\pm$ SD) do comprimento da cabeça ( $\mu$ m) por estágio de copepoditos de *T. biminiensis* observados ao final das manipulações do estudo de AIT com as amostras de água superficial coletadas em Suape em Setembro de 2013.

Ponto	P0				P1.5				P3.8			
	CI	C2	C3	C4	CI	C2	C3	C4	CI	C2	C3	C4
Baseline	150 $\pm$ 11	159 $\pm$ 11	188 $\pm$ 18	239 $\pm$ 14	160 #	169 $\pm$ 24	170 $\pm$ 18	220 $\pm$ 32	-	184 $\pm$ 24	221 $\pm$ 24	259 $\pm$ 29
EDTA	148 $\pm$ 5	<b>174 <math>\pm</math> 14*</b>	191 $\pm$ 14	228 $\pm$ 34	153 $\pm$ 5	172 $\pm$ 10	<b>197 <math>\pm</math> 10*</b>	225 $\pm$ 7	123 $\pm$ 21	159 $\pm$ 16**	210 $\pm$ 33	228 $\pm$ 25**
Tiosulfato	175 $\pm$ 35	<b>185 <math>\pm</math> 14*</b>	199 $\pm$ 11	236 $\pm$ 33	143 $\pm$ 19	176 $\pm$ 18	<b>202 <math>\pm</math> 24*</b>	255 $\pm$ 7	-	174 $\pm$ 12	188 $\pm$ 18**	246 $\pm$ 21
Zeólita Purina	149 $\pm$ 10	<b>171 <math>\pm</math> 12*</b>	203 $\pm$ 10	245 $\pm$ 7	153 $\pm$ 7	175 $\pm$ 14	<b>203 <math>\pm</math> 15*</b>	250 $\pm$ 1	120 $\pm$ 28	165 $\pm$ 12	205 $\pm$ 15	233 $\pm$ 29
Zeótica Multi	143 $\pm$ 17	158 $\pm$ 10	193 $\pm$ 9	218 $\pm$ 17	150 $\pm$ 1	175 $\pm$ 11	<b>194 <math>\pm</math> 17*</b>	223 $\pm$ 15	-	152 $\pm$ 17**	209 $\pm$ 27	221 $\pm$ 28**
Aeração	150 $\pm$ 8	158 $\pm$ 9	192 $\pm$ 16	221 $\pm$ 18	150 $\pm$ 1	172 $\pm$ 14	183 $\pm$ 18	219 $\pm$ 26	147 $\pm$ 6	<b>210 <math>\pm</math> 1*</b>	195 $\pm$ 19	240 $\pm$ 27
Filtração	-	<b>168 <math>\pm</math> 15*</b>	199 $\pm$ 11	245 $\pm$ 29	152 $\pm$ 8	167 $\pm$ 17	185 $\pm$ 17	212 $\pm$ 22	-	174 $\pm$ 25	217 $\pm$ 15	257 $\pm$ 31
pH 6 24h	153 $\pm$ 5	<b>178 <math>\pm</math> 9*</b>	200 $\pm$ 13	231 $\pm$ 31	146 $\pm$ 12	170 $\pm$ 14	215 $\pm$ 21	235 $\pm$ 7	-	170 $\pm$ 8	229 $\pm$ 51	238 $\pm$ 21
pH 9 24h	140 $\pm$ 1	159 $\pm$ 14	190 $\pm$ 12	212 $\pm$ 8**	152 $\pm$ 15	181 $\pm$ 23	187 $\pm$ 31	220 #	-	158 $\pm$ 12**	182 $\pm$ 31**	234 $\pm$ 30**
pH 6 1h	148 $\pm$ 9	<b>177 <math>\pm</math> 10*</b>	206 $\pm$ 14	233 $\pm$ 21	139 $\pm$ 11	172 $\pm$ 17	194 $\pm$ 13	210 $\pm$ 10	170 #	183 $\pm$ 10	211 $\pm$ 13	244 $\pm$ 22
pH 9 1h	147 $\pm$ 6	<b>170 <math>\pm</math> 12*</b>	198 $\pm$ 11	234 $\pm$ 17	144 $\pm$ 8	172 $\pm$ 12	177 $\pm$ 23	210 $\pm$ 10	-	177 $\pm$ 19	216 $\pm$ 15	261 $\pm$ 28
<i>Ulva</i> sp.	-	160 #	<b>215 <math>\pm</math> 14*</b>	251 $\pm$ 30	156 $\pm$ 13	156 $\pm$ 8	181 $\pm$ 17	198 $\pm$ 11	-	175 $\pm$ 7	208 $\pm$ 30	242 $\pm$ 20
Col. Polimérica	-	166 $\pm$ 22	202 $\pm$ 15	245 $\pm$ 36	128 $\pm$ 26	159 $\pm$ 18	<b>202 <math>\pm</math> 11*</b>	257 $\pm$ 43	150 #	186 $\pm$ 16	210 $\pm$ 22	272 $\pm$ 56
Coluna C18	145 $\pm$ 7	<b>176 <math>\pm</math> 13*</b>	195 $\pm$ 9	<b>278 <math>\pm</math> 44*</b>	155 $\pm$ 6	165 $\pm$ 11	<b>186 <math>\pm</math> 9*</b>	223 $\pm$ 20	-	180 $\pm$ 1	226 $\pm$ 33	251 $\pm$ 25

(\*) Diferença estatística significativa Teste t ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*): Tratamento acarretou toxicidade à amostra; (#) Apenas um indivíduo, não entrou na análise estatística; (-) Não apresentou o estágio.

#### 5.4.4.3 Frequência dos estágios de desenvolvimento

O parâmetro de frequência de estágios de desenvolvimento dos copepoditos indicou diferenças estatísticas significativas (Teste G,  $p \leq 0,05$ ) entre o *baseline* e as manipulações realizadas com as amostras de água coletadas em Suape (Tabela 5.8 e 5.9), sendo observados casos de redução ou aumento da toxicidade após algumas manipulações.

**Tabela 5.8-** Frequência (C1:C2:C3:C4 em %) de estágios de copepoditos de *T. biminiensis* antes e após as manipulações de AIT com amostras coletadas em Suape em Abril de 2013.

Ponto	P1.5	P3.8
Baseline I	2,5:7,5:57,5:32,5	0:10:65:25
EDTA	2,5:22,5:35:40** (G=13,5817; p=0,0035)	0:5:57,5:37,5 (G=4,6754; p=0,1972)
Tiosulfato de sódio	<b>0:7,5:37,5:55*</b> (G=12,5478; p=0,0057)	<b>0:0:35:65*</b> G=41,4179; p≤0,0001
Zeólita Purina	<b>0:0:47,5:52,5*</b> (G=17,9251; p=0,0005)	0:5:60:35 G=3,5735; p=0,3114
Aeração	2,5:15:37,5:45** (G=8,4456; p=0,0376)	<b>2,5:5:40:52,5*</b> G=19,5696; p=0,0002
Filtração	<b>0:0:55:45*</b> (G=14,6044; p=0,0022)	<b>0:2,5:20:77,5*</b> G=58,1157; p≤0,0001
Baseline II	7:15:23:55	0:25:37,5:37,5
pH 6 24h	<b>0:0:20:80*</b> (G=28,2252; p≤0,0001)	2,5:17,7:30:50 (G=6,9108; p=0,0748)
pH 9 24h	<b>0:2,5:32,5:65*</b> (G=22,1822; p≤0,0001)	<b>2,5:2,5:42,5:52,5*</b> (G=25,7088; p≤0,0001)
<i>Ulva</i> sp.	<b>0:2,5:25:72,5*</b> (G=22,0564; p≤0,0001)	<b>2:13:25:60*</b> (G=14,3939; p=0,0024)
Coluna Polimérica	<b>0:3:10:87*</b> (G=24,4541; p≤0,0001)	<b>0:10:20:70*</b> (G=22,034; p≤0,0001)
Coluna C18	<b>0:10:12,5:77,5*</b> (G=17,5429; p=0,0005)	<b>0:5:22,5:72,5*</b> (G=29,6776 p≤0,0001)

(\*) Redução da toxicidade: Teste G ( $p \leq 0,05$ ) e  $\sum C3C4_{manipulação} \geq \sum C3C4_{baseline}$ .

(\*\*) Aumento da toxicidade da amostra: Teste G ( $p \leq 0,05$ ) e  $\sum C1C2_{manipulação} \geq \sum C1C2_{baseline}$ .

**Tabela 5.9-** Frequência (C1:C2:C3:C4 em %) de estágios de copepoditos de *T. biminiensis* antes e após as manipulações de AIT com amostras coletadas em Suape em Setembro de 2013.

Ponto	P0	P1.5	P3.8
Baseline	15:42,5:15:27,5	2,5:45:27,5:25	0:17,5:32,5:50
EDTA	<b>10:25:32,5:32,5*</b> (G=12,4336,p=0,006)	17,5:55:22,5:5** (G=28,2035,p≤0,0001)	7,5:17,5:35:40** (G=11,2601,p=0,0104)
Tiosulfato de sódio	<b>5:20:47,5:27,5*</b> (G=30,7872,p≤0,0001)	22,5:40:32,5:5** (G=33,1354,p≤0,0001)	0:22,5:40:37,5 (G=3,1957,p=0,3624)
Zeólita Purina	32,5:47,5:15:5** (G=23,6682,p≤0,0001)	20:52,5:22,5:5** (G=30,6022,p≤0,0001)	5:27,5:37,5:30 (G=14,0133,p=0,0029)
Zeólita Multi	32,5:37,5:20:10** (G=15,9015 ,p=0,0012)	20:37,5:35:7,5** (G=26,5847,p≤0,0001)	0:35:30:35 (G=8,7075,p=0,0334)
Aeração	10:45:27,5:17,5 (G=6,9438,p=0,0737)	12,5:42,5:25:20** (G=7,8747,p=0,0487)	<b>7,5:5:17,5:70*</b> (G=25,671,p≤0,0001)
Filtração	<b>0:47,5:27,5:25*</b> (G=24,4527,p≤0,0001)	12,5:65:10:12,5** (G=23,6741,p≤0,0001)	0:12,5:22,5:65 (G=4,6277,p=0,02012)
pH 6 24h	<b>10:20:32,5:37,5*</b> (G=17,1874,p=0,0006)	60:30:5:5** (G=98,9165,p≤0,0001)	0:10:25:65 (G=5,0148,p=0,1707)
pH 9 24h	<b>5:42,5:37,5:15*</b> (G=18,6178,p=0,0003)	42,5:40:15:2,5** (G=67,4673,p≤0,0001)	0:15:30:55 (G=0,5307,p=0,9121)
pH 6 1h	25:45:22,5:7,5** (G=16,0265,p=0,0011)	20:47,5:25:7,5** (G=25,2018,p≤0,0001)	2,5:10:37,5:50 (G=5,4787,p=0,1399)
pH 9 1h	<b>7,5:37,5:30:25*</b> (G=7,9537,p=0,047)	25:42,5:25:7,5** (G=31,0211,p≤0,0001)	0:17,5:47,5:35 (G=5,4902,p=0,1392)
<i>Ulva</i> sp.	<b>0:2,5:15:82,5*</b> (G=90,7358,p≤0,0001)	25:37,5:25:12,5** (G=26,0305,p≤0,0001)	<b>0:5:37,5:57,5*</b> (G=8,236,p=0,0414)
Coluna Polimérica	<b>0:17,5:45:37,5*</b> (G=47,8965,p≤0,0001)	10:37,5:37,5:15** (G=9,3735,p=0,0247)	2,5:17,5:50:30 (G=11,4075,p=0,0097)
Coluna C18	<b>5:45:27,5:22,5*</b> (G=9,3799,p=0,0246)	10:37,5:35:17,5 (G=7,5742,p=0,0557)	<b>0:7,5:20:72,5*</b> (G=11,2753,p=0,0103)

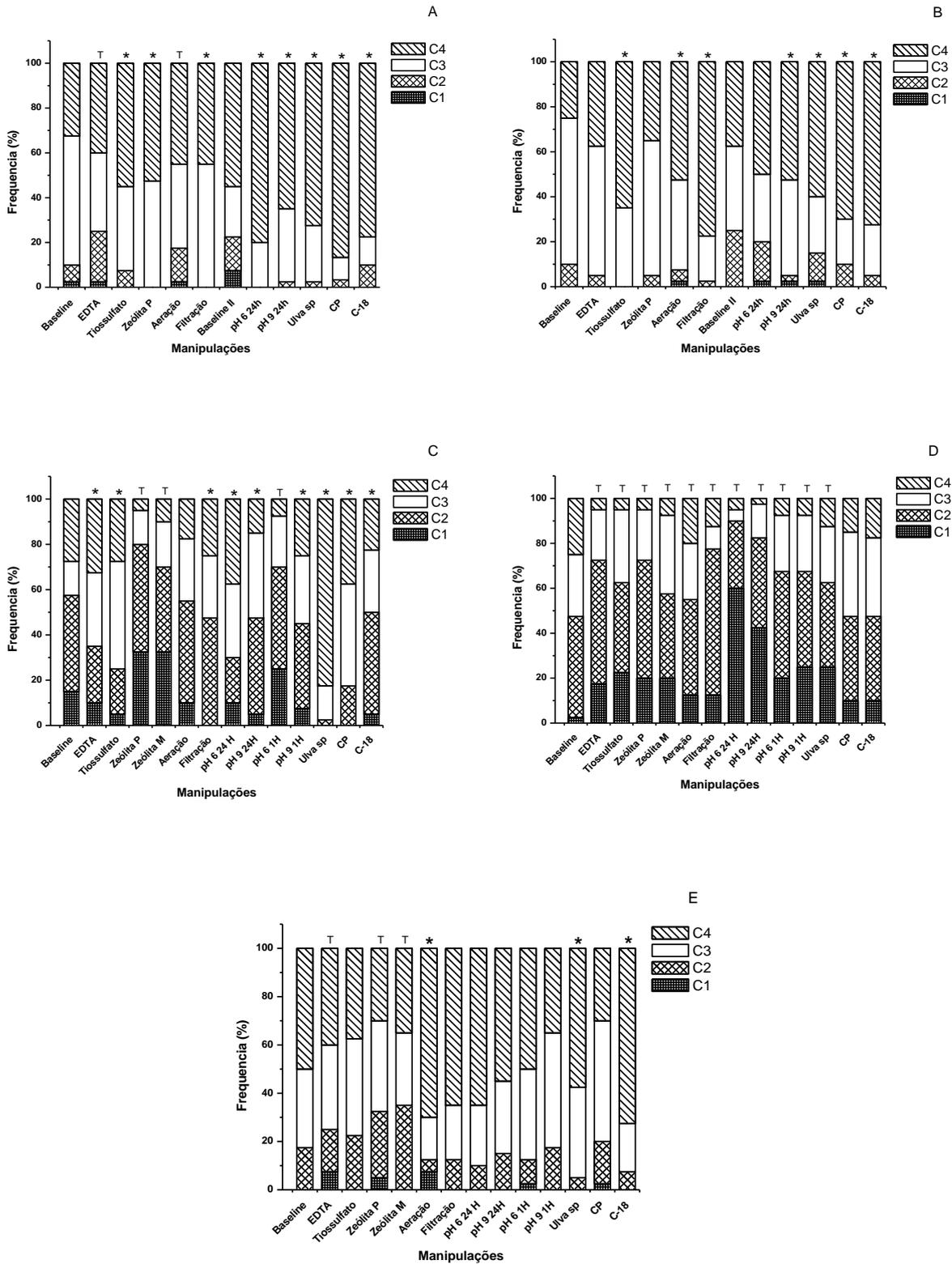
(\*) Redução da toxicidade: Teste G ( $p \leq 0,05$ ) e  $\sum C3C4_{manipulação} \geq \sum C3C4_{baseline}$ .

(\*\*) Aumento da toxicidade da amostra: Teste G ( $p \leq 0,05$ ) e  $\sum C1C2_{manipulação} \geq \sum C1C2_{baseline}$ .

As frequências dos estágios de copepoditos de *T. biminiensis* do *baseline* e das manipulações das amostras de 2013 estão na Figura 5.5. No mês de Abril, o teste de G indicou que no ponto P1.5 as manipulações de Tiossulfato, Zeólita Purina, Filtração, pH6/24h, pH9/24h, *Ulva* sp., Coluna Polimérica e Coluna C-18 resultaram em redução significativa da toxicidade considerando este parâmetro (Figura 5.5A). Já as manipulações com EDTA e Aeração causaram aumento da toxicidade. Para o P3.8 (Figura 5.5B), houve redução significativa da toxicidade após as manipulações de Tiossulfato, Aeração, Filtração, pH9/24h, *Ulva* sp., Coluna Polimérica e Coluna C-18. Nenhuma das manipulações acarretou toxicidade à amostra em questão.

Para o mês de Setembro, foi verificado que a toxicidade do P0 foi reduzida após as manipulações de EDTA, Tiossulfato, Filtração, pH6/24h e pH9/1h. As manipulações com as duas zeólitas e pH 6/1h aumentaram a toxicidade desta amostra (Figura 5.5C). Para o P1.5 (Figura 5.5D) foi observada maior incidência do estágio de copepodito C1 após todas as manipulações, com indicação de aumento significativo da toxicidade da amostra, exceto após as Colunas Polimérica e C-18. O P3.8 teve sua toxicidade reduzida significativamente após as manipulações de Aeração, *Ulva* sp. e Coluna C-18. As manipulações com EDTA e as zeólitas causaram aumento da toxicidade (Figura 5.5E).

Os resultados obtidos no estudo de AIT com as amostras de água coletadas em Suape no meses de Abril e Setembro de 2013 encontram-se resumidos nas tabelas 5.10 e 5.11, respectivamente. Em Abril, os parâmetros de comprimento médio da cabeça e frequência de estágio de copepoditos forneceram mais respostas quanto à redução da toxicidade do P1.5. A frequência de estágios também foi o parâmetro mais sensível à redução da toxicidade do P3.8. Em Setembro, o comprimento médio da cabeça por estágio (C2) e a frequência de estágios foram os parâmetros que mais se aproximaram das respostas quanto à indicação da redução da toxicidade do P0 comparados aos parâmetros de mortalidade, desenvolvimento e inibição. Para o P1.5, o parâmetro de comprimento médio da cabeça no estágio de copepoditos C3 foi o que mais se aproximou das respostas obtidas para os parâmetros. Para o P3.8, a frequência de estágios indicou redução da toxicidade da amostra após as manipulações de Aeração, *Ulva* sp. e coluna C-18, sendo observada redução da toxicidade para as duas últimas manipulações apenas para o parâmetro em questão.



**Figura 5.5-** Frequência de estágios de desenvolvimento dos copepoditos de *T. biminiensis* no estudo de AIT com amostras do P1.5 (A) e P3.8 (B), mês de Abril, e do P0 (C), P1.5 (D) e P3.8 (E), mês de Setembro de 2013. (\*) Diferença estatística significativa e (T) indica aumento significativo de toxicidade em relação ao *baseline* utilizando teste G ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 5.10-** Síntese dos resultados obtidos no estudo de AIT com as amostras de Suape coletadas em Abril de 2013 utilizando o teste com náuplios de *T. biminiensis* e os parâmetros de Mortalidade (M), Desenvolvimento (D), Inibição (I), Comprimento Médio da Cabeça (CM), Comprimento Médio por Estágio (CME) e Frequência dos Estágios (FE).

Ponto	Parâmetro	EDTA	Tiosulfato	Zeólita Purina	Aeração	Filtração	pH 6 24h	pH 9 24h	<i>Ulva</i> sp.	Coluna Polimérica	Coluna C-18
P1.5	<i>M</i> (%)	-	T	-	-	-	-	-	-	R	-
	<i>D</i> (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>I</i> (%)	-	T	-	-	-	-	-	-	R	-
	<i>CM</i> ( $\mu\text{m}$ )	-	-	-	-	-	R	R	R	R	-
	<i>C1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>CME</i> <i>C2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
	( $\mu\text{m}$ ) <i>C3</i>	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	<i>C4</i>	T	-	-	-	T	-	R	-	-	-
<i>FE</i>	T	R	R	T	R	R	R	R	R	R	
P3.8	<i>M</i> (%)	-	-	-	R	R	-	-	R	R	-
	<i>D</i> (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>I</i> (%)	-	-	-	R	R	-	-	R	R	-
	<i>CM</i> ( $\mu\text{m}$ )	-	R	-	-	R	-	R	-	-	-
	<i>C1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>CME</i> <i>C2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
	( $\mu\text{m}$ ) <i>C3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C4</i>	-	R	-	-	R	-	R	-	-	-
<i>FE</i>	-	R	-	R	R	-	R	R	R	R	

(R): Redução da toxicidade; (T): Aumento da toxicidade após a manipulação; (-): Sem diferença estatística significativa.



<i>Ponto</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>EDTA</i>	<i>Tiossulfato</i>	<i>Zeólita Purina</i>	<i>Zeólita Multi</i>	<i>Aeração</i>	<i>Filtração</i>	<i>pH 6 24h</i>	<i>pH 9 24h</i>	<i>pH 6 1h</i>	<i>pH 9 1h</i>	<i>Ulva sp.</i>	<i>Coluna Polimérica</i>	<i>Coluna C-18</i>
P3.8	<i>M (%)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
	<i>D (%)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>I (%)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
	<i>CM (µm)</i>	T	-	T	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	<i>CI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>CME</i>	T	-	-	T	R	-	-	T	-	-	-	-	-
	<i>(µm)</i>	-	T	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	<i>C4</i>	T	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	<i>FE</i>	T	-	T	T	R	-	-	-	-	-	R	-	R

(R): Redução da toxicidade; (T): Aumento da toxicidade após a manipulação; (-): Sem diferença estatística significativa.

#### 5.4.5 Análises Químicas

##### 5.4.5.1 Análise de Nitrogênio Amoniacal Total Dissolvido

Os resultados do NAT para os pontos coletados em Setembro de 2013 (Tabela 5.12) indicam que após o tratamento com a macroalga *Ulva* sp. houve redução na concentração do NAT para P0 e P1.5 e aumento para o P3.8.

**Tabela 5.12-** Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de NAT nas amostras de água coletadas em Setembro de 2013 antes e depois do tratamento com *Ulva* sp.

<i>Amostra</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>
<i>P0</i>	$0,0045 \pm 0,0003$	$0,0033 \pm 0,0007$
<i>P1.5</i>	$0,0033 \pm 0,0004$	$0,0017 \pm 0,0008$
<i>P3.8</i>	$0,0014 \pm 0,0006$	$0,0046 \pm 0,0006$

##### 5.4.5.2 Análise de HAPDDs

As concentrações totais dos HAPDDs nas amostras coletadas em Suape em Setembro de 2013 foram  $0,13 \pm 0,02$ ;  $0,24 \pm 0,05$  e  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  de equivalentes de criseno para P0, P1.5 e P3.8, respectivamente.

##### 5.4.5.3 Análise de Metais

Os resultados das análises de metais nas amostras de água e de algas (antes e depois do tratamento com *Ulva* sp.) encontram-se na Tabela 5.13. As amostras estão em conformidade com a Resolução n° 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) para Fe, Mn, Zn (limites máximos de 0,3; 0,1 e 0,09  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente -Águas Salinas Classe 1) e V (limite de 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ -Águas Doces, uma vez que há limite estabelecido para Águas Salinas). As concentrações do metal Fe de todas as amostras de água estudadas foram reduzidas após o tratamento com *Ulva* sp.

**Tabela 5.13-** Concentração de metais totais nas amostras de água ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e algas ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) antes e depois da manipulação de AIT com *Ulva* sp.

Ponto	P0				P1.5				P3.8			
	Água	Água	Alga	Alga	Água	Água	Alga	Alga	Água	Água	Alga	Alga
Metal	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Al	-	0,0924**	253,5	441	-	0,1635**	253,5	470,5	-	0,0729**	260,5	236
As	-	-	4,1	-	-	-	4,1	3,7	-	-	-	-
Cd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	4,55	4,05	-	-	4,55	4,9	-	-	-	-
Cr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	0,1999	<b>0,1048*</b>	371	372	0,1754	<b>0,1585*</b>	371	415,5	0,154	<b>0,0705*</b>	244,5	249,5
Mn	0,021	0,0876**	13	13,5	-	0,0678**	13	10,25	-	-	10,35	10,75
Ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	0,005	- *	12,45	8,45	0,0055	- *	12,45	15,5	-	0,0262**	21,5	19
V	0,023	0,1025**	-	-	0,0224	0,1055**	-	-	0,0216	0,044**	-	-
Co	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Concentração inferior ao limite de detecção do método. (\*negrito) Houve redução da concentração do metal após a manipulação; (\*\*) Houve aumento da concentração do metal após a manipulação.

#### 5.4.5.4 Análise de Agrotóxicos

Não foram detectados nenhum dos 175 agrotóxicos analisados nas amostras coletadas em Suape em Setembro de 2013 (Anexo 1).

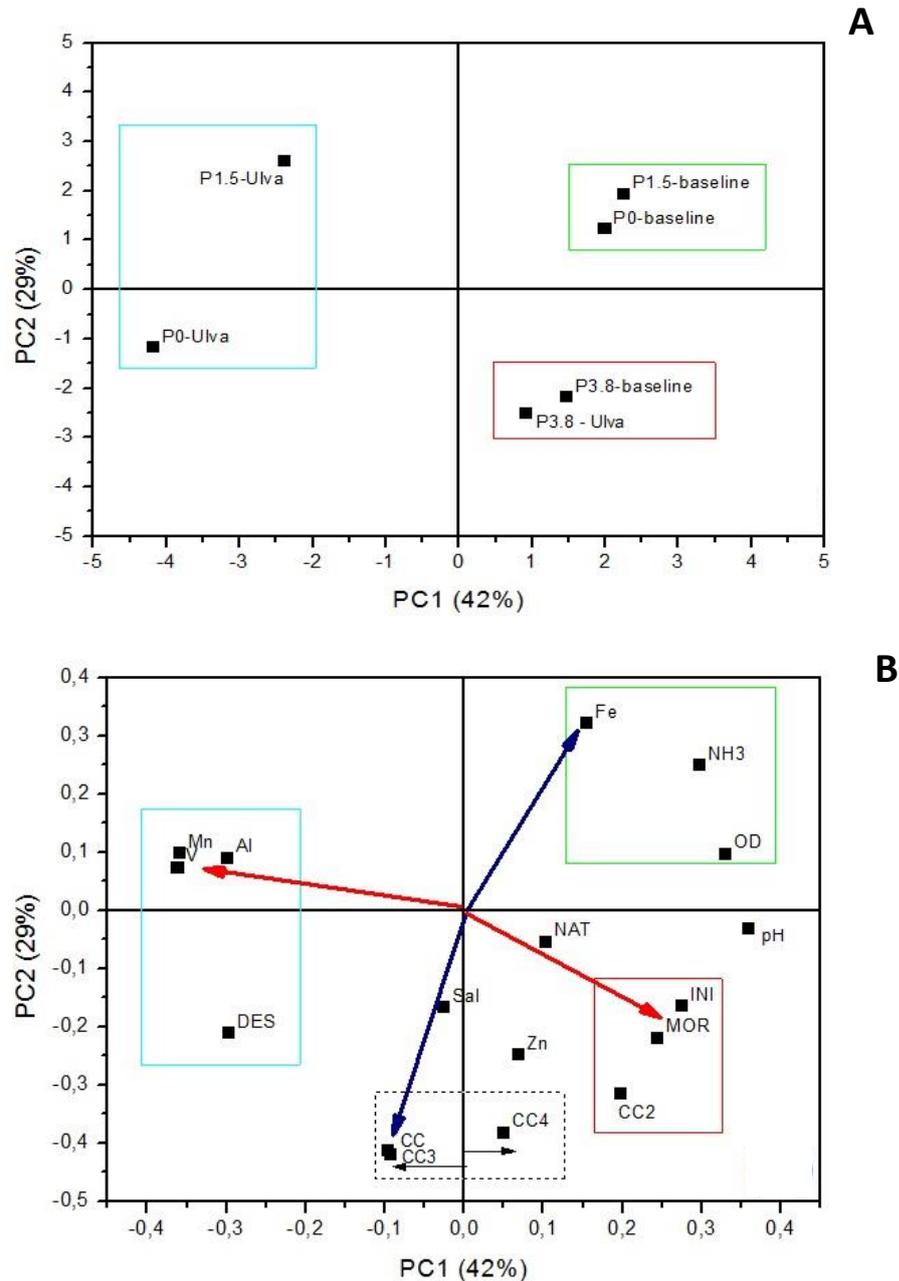
#### 5.4.6 Análise dos Componentes Principais

A figura 6.6 mostra os gráficos obtidos por ACP, onde as duas componentes principais PC1 e PC2 explicam 71% da informação do sistema. Analisando inicialmente PC1, que contém 42% da informação, observou-se a formação de três grupos distintos, sendo que na porção positiva do seu eixo encontraram-se todas as amostras não manipuladas (*baseline*) e apenas uma amostra manipulada (P3.8 *Ulva* sp.). As outras amostras tratadas com a macroalga *Ulva* (P0 *Ulva* sp. e P1.5 *Ulva* sp.) permaneceram na porção negativa de PC1 (Figura 5.6A). Tal comportamento sugere que, considerando os parâmetros avaliados, a manipulação não acarretou alterações significativas na amostra P3.8. Verificou-se também que o agrupamento apenas do ponto P3.8 sugere que este apresente um comportamento distinto, uma vez que, foi coletado no rio Massangana e apresenta certo isolamento em relação aos outros pontos (P0 e P1.5).

Os elementos Mn, V e Al apresentaram uma relação inversa com os parâmetros de mortalidade e inibição, mas direta com o desenvolvimento, sugerindo assim que podem ter contribuído para o maior desenvolvimento dos copépodos, atuando possivelmente como micronutrientes ou ser um efeito do enriquecimento da água provindo da macroalga, que retirou alguns metais tóxicos e aumentou outros, sendo um artefato estatístico (Figura 5.6B). Ainda neste contexto, verificou-se que os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e  $\text{NH}_3$  apresentaram maior variância no eixo positivo de PC1, e atuaram de forma antagonista aos elementos Mn, V e Al e ao parâmetro de desenvolvimento.

Analisando a segunda componente PC2, com 29% da informação, observa-se que o Fe possui maior variância na porção positiva deste eixo. Em oposição ao Fe estão o comprimento médio da cabeça e o comprimento da cabeça nos estágios C3 e C4. Isso pode indicar que este elemento pode estar associado diretamente com a redução do comprimento médio dos indivíduos, e também reduzindo os comprimentos nos estágios C3, C4 e C2, nesta ordem de relevância. Também é possível observar em PC2 que a diminuição dos níveis de amônia não-ionizada ( $\text{NH}_3$ ), estimados pelo kit colorimétrico, acarretou maior desenvolvimento dos copepoditos tratados com a *Ulva* sp. em relação aos *baselines*. Salinidade, NAT e Zn foram os

parâmetros menos significativos para a distribuição dos dados. Os parâmetros ecotoxicológicos de mortalidade, inibição e comprimento da cabeça no estágio de C2 foram agrupados, indicando que as respostas obtidas para estes parâmetros foram semelhantes, e representaram mais significativamente as amostras do P3.8.



**Figura 5.6-** Análise dos Componentes Principais (ACP) das variáveis hidrológicas (pH, SAL = salinidade, NH<sub>3</sub> = amônia não-ionizada e OD = oxigênio dissolvido), químicas (metais [Al, Fe, Mn, Zn, V] e NAT) e dos parâmetros ecotoxicológicos para os náuplios de *T. biminiensis* (MOR=mortalidade, DES=desenvolvimento, INI=inibição, CC=comprimento médio da cabeça, CC2=no estágio C2, CC3=no estágio C3 e CC4=no estágio  $\geq$  C4) obtidas nos P0, P1.5 e P3.8 coletados em Setembro de 2013 antes (*baseline*) a após o tratamento com *Ulva* sp.

Estes resultados sugerem que um sistema mais rico em Fe, mais oxidado, mais alcalino e com maior teor de amônia não-ionizada pode resultar em um ambiente com condições desfavoráveis ou mais tóxico para os náuplios de *T. biminiensis*. Desta forma, sugere-se que a amônia não-ionizada e os metais, mais especificamente o Fe, podem estar envolvidos com a toxicidade das amostras de água superficial de Suape.

## 5.5 Discussão

### 5.5.1 Teste com náuplios de *T. biminiensis* e sensibilidade à substância de referência

Testes de toxicidade têm sido sugeridos para aplicação da AIT, onde podem ser empregados desde testes padronizados até adaptações de métodos largamente difundidos, de novos organismos ou de novas técnicas. O objetivo é aplicar ensaios simples, rápidos, de baixo custo e com organismos-teste sensíveis, pois estes estudos geralmente são longos e bastante trabalhosos.

Dentre os novos testes utilizados em estudos de AIT, Strom et al. (2009) avaliaram o bioensaio de fluorescência da colorofila  $\alpha$  da microalga marinha *Isochrysis galbana* que conseguiu detectar contaminantes em concentrações ambientalmente relevantes e tolerar as manipulações físicas e químicas necessárias para a fase de caracterização da AIT. Zhang et al. (2012) desenvolveram um método para estudo de AIT baseado no efeito sobre o crescimento da alga de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* imobilizada em alginato e avaliaram amostras de sedimento integral. Biales et al. (2013) observaram os efeitos sobre a expressão gênica do anfípodo *Ampelisca abdita* utilizando sedimento tóxico e ressaltam a importância do uso de parâmetros ecotoxicológicos sensíveis e informativos nos estudos de AIT.

No presente trabalho, o teste com náuplios do copépodo bentônico *T. biminiensis* possibilitou o desenvolvimento do estudo de AIT com as amostras de água coletadas em Suape. Desta forma, a utilização de organismos sensíveis ou de fases de vida mais sensíveis, como os estágios naupliares dos copépodos, possibilitou a avaliação ecotoxicológica e a caracterização da toxicidade das amostras estudadas.

Os resultados dos testes de sensibilidade dos náuplios à substância de referência obtidos neste estudo corroboram àqueles apresentados por Lavorante et al. (2013) realizados para a mesma substância e empregando o mesmo teste de toxicidade. Desta forma, conclui-se que a sensibilidade dos náuplios empregados nos testes desenvolvidos permaneceu dentro da faixa de variação esperada e, portanto, contribui para a aceitabilidade dos resultados.

### 5.5.2 Sensibilidade dos náuplios do copépodo *T. biminiensis* aos reagentes do AIT

A adição de agentes químicos pode causar redução da toxicidade nos estudos de AIT, mas a toxicidade destas substâncias aos organismos empregados nos ensaios deve ser determinada visando eliminar a possibilidade de utilizar concentrações tóxicas dos reagentes aos organismos-teste, o que levaria a conclusões erradas.

A sensibilidade de alguns organismos marinhos aos reagentes frequentemente utilizados nas manipulações de AIT é indicada pelo protocolo da U.S.EPA (U.S.EPA, 1996; 2007), sendo considerada norteadora para realização de vários estudos. Hogan et al. (2005), visando manter consistência com o protocolo da U.S.EPA (1996), utilizaram concentrações superiores as CENOs previamente estimadas para o EDTA e o tiosulfato para a diatomácea marinha *Nitzschia closterium* e indicaram que sempre haja monitoramento para observação de efeitos tóxicos das manipulações. Já Nilin (2008) avaliou a toxicidade de amostras de elutriado do rio Ceará empregando o teste embriolarval com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e utilizou as concentrações de 3 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> para o EDTA e o tiosulfato, respectivamente, abaixo da indicação da U.S.EPA (1996).

No presente estudo, os testes de sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* ao EDTA e ao tiosulfato de sódio nortearam as condições específicas para realização dos ensaios, e mesmo assim em alguns momentos causaram aumento de toxicidade nas amostras. A CL<sub>50-72h</sub> obtida para o EDTA (390 mg L<sup>-1</sup>) foi cinco vezes superior à do tiosulfato de sódio (72 mg L<sup>-1</sup>), enquanto a menor CENO obtida nos testes foi de 100 mg L<sup>-1</sup> para o EDTA foi dez vezes superior àquela de 10 mg L<sup>-1</sup> para o tiosulfato de sódio, indicando que os náuplios de *T. biminiensis* são mais sensíveis ao tiosulfato de sódio que ao EDTA. A concentração final de EDTA definida para exposição dos náuplios foi de 100 mg L<sup>-1</sup> e foi a mesma utilizada por Resgalla Jr et al. (2012) em testes com embriões de ouriço-do-mar *Arbacia lixula*, porém superior a definida pelo guia da U.S.EPA (1996) (60 mg L<sup>-1</sup>). A concentração final definida para o tiosulfato foi de 15 mg L<sup>-1</sup>, inferior à empregada por Resgalla Jr et al. (2012) (100 mg L<sup>-1</sup>) e à indicada no guia da U.S.EPA (1996) (50 mg L<sup>-1</sup>).

A sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* ao EDTA foi superior a do bivalve *Crassostrea gigas* (CE<sub>50/48</sub> de 750 mg L<sup>-1</sup>), semelhante a do misidáceo *Mysidopsis bahia* (CL<sub>50/72</sub> de 318 mg L<sup>-1</sup>) e inferior a do anfípodo *Ampelisca abdita* (CL<sub>50/72</sub> de 164 mg L<sup>-1</sup>) (U.S.EPA, 1996), dos embriões do ouriço-do-mar *L. variegatus* e dos náuplios de *Nitocra* sp. (CENO 25 mg L<sup>-1</sup>) (FERRAZ, 2013). Para o tiosulfato de sódio, os náuplios de *T. biminiensis* apresentaram maior sensibilidade que *M. bahia* (CL<sub>50/72</sub> de 121 mg L<sup>-1</sup>), *A. abdita*

(CL<sub>50/72</sub> de 223 mg L<sup>-1</sup>) e *C. gigas* (CE<sub>50/48</sub> de 500 mg L<sup>-1</sup>) (U.S.EPA, 1996), embriões de *L. variegatus* (CENO 3200 mg L<sup>-1</sup>) e náuplios de *Nitocra* sp. (CENO 50 mg L<sup>-1</sup>) (FERRAZ, 2013).

### 5.5.3 Estudo de AIT

Os parâmetros ecotoxicológicos do teste com náuplios de *Tisbe biminiensis* permitiram confirmar e também obter novas informações acerca da toxicidade das amostras estudadas. Baseado nos resultados da fase de caracterização e das análises químicas, os possíveis agentes causadores da toxicidade dos pontos estão indicados na tabela 5.14.

**Tabela 5.14-** Indicação dos possíveis agentes tóxicos causadores da toxicidade após o estudo de AIT realizado com as amostras coletadas em Abril (A) e Setembro (S) de 2013 na área de Suape.

Ponto	Caracterização (fase I)	Análises Químicas (fase II)				Indicação dos agentes tóxicos
		Amônia	HAPDDs	Metais	Agrotóxicos	
P0	Compostos Orgânicos Metais Amônia Material Particulado Oxidantes Substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido e básico Compostos voláteis e/ou surfactantes	Baixa concentração*	Concentrações em nível sub-letal	Concentrações de Fe e Zn reduzidas após <i>Ulva</i> sp.	-	Compostos Orgânicos Metais Amônia Material Particulado Oxidantes Substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido e básico Compostos voláteis e/ou surfactantes
P1.5	Compostos Orgânicos (A, S) Metais (A, S) Amônia (A, S) Material Particulado (A, S) Oxidantes (A, S) Substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido e básico (A, S) Compostos voláteis e/ou surfactantes (S)	Baixa concentração*	Concentrações em nível sub-letal	Concentrações de Fe e Zn reduzidas após <i>Ulva</i> sp.	-	Compostos Orgânicos Metais Amônia Material Particulado Oxidantes Substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido e básico Compostos voláteis e/ou surfactantes
P3.8	Compostos Orgânicos (A, S)	Baixa	Concentrações em	Concentração de Fe	-	Compostos Orgânicos

Metais (A, S)	concentração*	nível sub-letal	reduzida após <i>Ulva</i>	Metais
Amônia (A, S)			sp.	Amônia
Material Particulado (A)				Material Particulado
Oxidantes (A)				Oxidantes
Substâncias degradadas/ transformadas em pH básico (A)				Substâncias degradadas/ transformadas em pH básico
Compostos voláteis e/ou surfactantes (A, S)				Compostos voláteis e/ou surfactantes

P0 coletado apenas no mês de Setembro. (-) Concentração abaixo do limite de quantificação do método. (\*) Possivelmente, devido à estocagem das amostras.

No P1.5, situada no estuário do rio Tatuoca, os principais agentes suspeitos de causar a toxicidade em Abril foram compostos orgânicos, metais, material particulado, oxidantes, substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido e básico. Em Setembro, a caracterização da toxicidade foi mais complexa, adicionando-se os compostos voláteis e/ou surfactantes como possíveis agentes tóxicos. A manipulação que acarretou diminuição da toxicidade em mais parâmetros toxicológicos foi a da coluna polimérica, capaz de reduzir os compostos orgânicos das amostras. O P1.5 está situado numa área sob influência direta de atividades de estaleiros e de indústrias que trabalham com petróleo. Além disto, recebe carga de poluentes transportados pelo rio Tatuoca, que conta com vários tipos de atividades industriais. Confirmando estes resultados, Souza-Santos e Araújo (2013) levantaram a hipótese de que no rio Tatuoca ocorreria acumulação dos contaminantes do período chuvoso no início do período seco.

O P3.8, localizado no estuário do rio Massangana, apresentou maior complexidade na caracterização da toxicidade no mês de Abril que foi relacionada principalmente à possível presença de compostos orgânicos, metais, material particulado, oxidantes, substâncias que podem ser degradadas/transformadas em pH básico e compostos voláteis. Em Setembro, houve redução da toxicidade em menor número de manipulações, sugerindo apenas os compostos orgânicos, metais e compostos voláteis e/ou surfactantes como os principais agentes tóxicos. Embora próximo ao ponto não haja influência direta de atividades potencialmente poluidoras, este fato também pode estar relacionado à presença de várias indústrias localizadas ao longo do curso do rio que lançam seus efluentes neste corpo hídrico e ao período de chuvas que aumentam as descargas de água que podem transportar mais contaminantes do continente para o ambiente aquático.

O ponto P0, situado num local próximo ao dique portuário e de recebimento de efluentes relacionados à indústria petroquímica, respondeu a todas as manipulações empregadas no estudo de AIT, sendo considerado o ponto de maior complexidade quanto à caracterização toxicológica dentre os pontos avaliados. Dentre as manipulações, a Coluna C-18, a *Ulva* sp e a Filtração se destacaram pois foram as que mais produziram resultados de redução para os diferentes parâmetros estudados, indicando como principais agentes tóxicos os compostos orgânicos, metais, amônia e o material particulado. As análises químicas realizadas indicaram a presença de HAPDDs, metais e NAT em baixas concentrações para todos os pontos estudados no mês de Setembro de 2013.

A manipulação com EDTA apresenta especificidade para alguns agentes tóxicos como os cátions de Al, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Sr, Zn, etc. O EDTA não forma complexos

com metais aniônicos e forma apenas fracamente com Ag, Cr e Tl (U.S.EPA, 1996). Apesar da preocupação com a salinidade da água, adições de EDTA são eficazes na remoção de cátions tóxicos em amostras aquosas marinhas (STUMM e MORGAN, 1981). O EDTA também pode reduzir a toxicidade de surfactantes catiônicos, portanto é importante observar os resultados da etapa de aeração (MATOS, 2011). No mês de Abril, não houve redução da toxicidade das amostras após a manipulação com EDTA. Em Setembro, a redução da toxicidade após esta manipulação foi observada principalmente no P0 (considerando os parâmetros de desenvolvimento, CME no estágio C3 e frequência de estágios), mas também no P1.5 (apenas para o parâmetro do CME no estágio C3) indicando os metais como possíveis causadores da toxicidade.

Os metais traço presentes nos ambientes costeiros têm seus ciclos biogeoquímicos complexos e abrangentes. Muitos metais podem se apresentar na água sob diferentes formas químicas e também podem sofrer reações de oxidação, redução, precipitação, adsorção, agregação, etc (BAPTISTA-NETO, 2008). Metais podem ser adsorvidos pelo material em suspensão, podem formar complexos com inúmeros compostos orgânicos naturais ou sintéticos. O equilíbrio desses processos é influenciado principalmente pelo pH, temperatura, estado de oxidação e tipo de ligante (LYMAN, 1995). O aumento das concentrações de metais no ambiente pode ser ocasionado por lançamentos indevidos de efluentes industriais, como os gerados em indústrias de galvanização, de químicos diversos, de ferro e aço, de couro, tintas, lavanderias e indústrias de petróleo. Estes metais podem ocasionar desequilíbrio para o ecossistema e risco potencial para biota e saúde humana (CETESB, 2006).

Os metais detectados nas análises das amostras de água coletadas no complexo estuarino de Suape em Setembro foram Fe, Mn, Zn e V. Estes elementos constituem os metais traço, encontrados em concentrações inferiores a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , e são considerados essenciais para alguns seres vivos atuando em diversos processos fisiológicos, porém em concentrações mais elevadas podem ser tóxicos (MEC, 2013). As concentrações de metais presentes em todas as amostras permaneceram abaixo dos limites estabelecidos na legislação ambiental vigente (CONAMA, 2005).

O Fe é um metal essencial muito abundante na crosta terrestre e bastante utilizado na produção de ligas metálicas e de aço, sendo estes materiais empregados pela indústria automotiva e naval e pela construção civil (MEC, 2013). A legislação ambiental brasileira determina apenas o valor máximo para Fe na sua forma dissolvida permitindo concentrações de até  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  em águas salinas (CONAMA, 2005). No presente estudo, foram quantificadas as concentrações de Fe total nas amostras de água cujos valores permaneceram

abaixo deste limite. Entretanto, dados da *Pesticides Action Network* –PAN (PAN, 2014) , base de dados de estudos de toxicidade com organismos aquáticos, relatam uma  $CE_{50}$  entre 0,0004 e 0,004  $mg L^{-1}$  de Fe total para o ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* e de 0,008  $mg L^{-1}$  de Fe total para larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, concentrações bem abaixo dos valores detectados nas amostras ambientais deste estudo. Desta forma, mesmo estando abaixo do limite CONAMA, o ferro pode estar causando parte da toxicidade nas amostras coletadas na região de Suape.

O Mn é bastante utilizado pela indústria siderúrgica, principalmente na produção de ligas metálicas. Além disto, participa na composição de fertilizantes, ração animal e fabricação de pilhas (CETESB, 2012). No presente estudo, foi verificado teor inicial de Mn apenas na amostra do P0 (0,021  $mg L^{-1}$ ), contudo o valor está abaixo do limite máximo permitido em águas salinas que é de 0,1  $mg L^{-1}$  de Mn total (CONAMA, 2005) e da  $CL_{50/48h}$  para larvas do copépodo Harpacticoida *Canthocamptus* sp. que é de 0,049  $mg L^{-1}$  de Mn total (PAN, 2014). Nos pontos P1.5 e P3.8 não foram observados níveis detectáveis deste metal, porém após o tratamento com *Ulva* sp foi constatada sua presença no P1.5. Diante do exposto, o Mn não pode ser considerado um dos agentes tóxicos dos pontos em questão uma vez que houve redução da toxicidade dos P0 após a manipulação com a macroalga e a toxicidade do P1.5 não foi alterada, mesmo com o incremento das concentrações deste elemento em ambas as amostras de água após a exposição à macroalga, indicando que houve transferência deste elemento da alga para a água.

O Zn é bastante empregado em revestimentos e galvanização do aço e do ferro para prevenir corrosão (CETESB, 2012). A  $CL_{50}$  de Zn para náuplios de *Tisbe biminiensis* é de 0,79  $mg L^{-1}$  (LAVORANTE et al., 2013) e a  $CE_{50}$  para larvas do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* é de 0,048  $mg L^{-1}$  (ROSSATO et al., 2009). A concentração do Zn nas amostras de água de Suape permaneceram bem abaixo das concentrações acima descritas e do teor de 0,09  $mg L^{-1}$  de Zn total considerado o valor máximo permitido pelo CONAMA (CONAMA, 2005).

O V é empregado na metalurgia, principalmente na produção de aços especiais de alta resistência, na indústria de cerâmicas, vidros, tintas e esmaltes. Altas concentrações deste elemento costumam ser encontradas em óleo bruto de petróleo (CETESB, 2012). O teor máximo deste elemento é definido apenas para águas doces, sendo considerada a concentração de 0,1  $mg L^{-1}$  de V total. Dados da PAN relatam que a  $CE_{50}$  do V para o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* foi de 0,028 a 0,056  $mg L^{-1}$  (PAN, 2014). As concentrações iniciais das amostras de água coletadas em Suape foram em média de 0,02  $mg L^{-1}$  de V total,

aproximadamente o valor da CE para o ouriço. Entretanto, houve um incremento destas concentrações após a manipulação com a macroalga, sugerindo que pode ter ocorrido uma contaminação externa já que a alga não apresentou níveis detectáveis de V. Deste modo, observa-se que não há como afirmar a contribuição deste metal para a toxicidade observada inicialmente nas amostras.

Além das fontes industriais, os metais podem estar presentes nos efluentes domésticos, pois são constituintes de vários produtos como remédios, materiais de limpeza e higiene pessoal, tintas, óleos lubrificantes e combustíveis. Desta forma, o aporte destes efluentes constitui uma importante fonte de metais para o ambiente costeiro e marinho. Observou-se que os P0 e P1.5 apresentaram maior diversidade de espécies de metais quantificados comparado ao P3.8. As análises de metais indicaram situações de comportamento distinto durante o estudo de AIT com as amostras. A amostra de água do P0 (localizado próximo à zona de dique portuário e da liberação de efluente petroquímico) apresentou maior diversidade de metais: Fe, Mn, Zn e V. Após o tratamento com a macroalga *Ulva* sp, houve redução dos níveis de Fe e Zn e redução da toxicidade considerando seis dos nove parâmetros ecotoxicológicos avaliados. Nesta amostra foi observada contaminação por Al após esta manipulação. Em relação à amostra coletada no P1.5, esta apresentou inicialmente Fe, Zn e V e após o tratamento, houve redução das concentrações de Fe e Zn e contaminação por Al e Mn, porém não foi observada redução da toxicidade. Na amostra do P3.8, coletada no estuário do rio Massangana, observou-se inicialmente apenas a presença de Fe e V com posterior diminuição da concentração de Fe e da toxicidade considerando o parâmetro de frequência de estágios de copepoditos após o tratamento com *Ulva* sp.. Entretanto, foi observado o aumento dos níveis de Al, Zn e V.

Vale ressaltar que a alga utilizada nos tratamentos, coletadas na praia de Boa Viagem, região metropolitana no Recife, apesar de permanecer em água do mar controle sob aeração por 24 horas antes dos testes, apresentou concentrações elevadas de Al, Fe, Mn e Zn e apresentou também As e Cu para os testes do P0 e P1.5. Este fato pode explicar a contaminação nas amostras de água após o tratamento com a macroalga, principalmente por Al.

O Al é bastante abundante no ambiente terrestre, porém em águas marinhas não é encontrado em elevadas concentrações devido a sua baixa solubilidade em água. É utilizado na indústria automobilística, construção civil, elétrica e eletrônica, na fabricação de ligas metálicas, utensílios domésticos e embalagens. Os sais de alumínio são também muito empregados como coagulantes no tratamento da água para reduzir matéria orgânica, cor,

turbidez e microrganismos (CETESB, 2012). A concentração máxima de Al permitida para águas salinas é de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de Al dissolvido (CONAMA, 2005).

As águas intersticiais podem apresentar altas concentrações de elementos traço e são capazes de influenciar a concentração em águas superficiais por meio de vários processos naturais como difusão e bioturvação e também por processos antrópicos como a dragagem (BAPTISTA-NETO, 2008), atividade frequente em regiões portuárias, como a de SUAPE. As concentrações de metais no sedimento de Suape foram estudadas por diferentes autores que afirmam que os níveis de metais são considerados baixos quando comparados com valores encontrados em áreas consideradas contaminadas (MARQUES et al., 2011), porém concentrações de risco foram observadas para Cd (TEÓDULO, 2004; ARAÚJO-CASTRO, 2008), Cr e Pb (CHAGAS, 2003). Araújo-Castro (2008) empregou o teste com fêmeas de *T. biminiensis* e analisou os teores de metais em amostras de sedimento coletadas em Suape no ano de 2003. A autora observou que dentre os metais, apenas o Cd, na estação localizada na baía sob influência do Porto, apresentou concentração na qual efeitos tóxicos poderiam ser ocasionalmente esperados. Estes elementos não foram detectados nas amostras de água analisadas neste trabalho. Estudando metais em amostras de sedimento do mesmo local, Marques et al. (2011) relatam que, apesar de ainda serem consideradas baixas, as concentrações de metais vem aumentando ao longo dos anos, fato que pode estar associado ao incremento das atividades industriais na área que contribuem para o acréscimo da carga de poluentes. Os mesmos autores observaram que os metais analisados possuíam baixas variabilidades espaciais, com distribuição absoluta: Fe>Al>V>Mn>Zn>Cr>Cu>Pb~Cd, corroborando as espécies de metais detectadas nas amostras de água do presente estudo.

Os metais podem apresentar elevada toxicidade para os copépodos, podendo ser acumulados através de seu fino exoesqueleto e pelos tecidos moles especialmente durante a muda, ou por ingestão e assimilação de partículas associadas a metais (HAGOPIAN-SCHLEKAT et al., 2001). Vale ressaltar que os quatro metais quantificados nas amostras de água deste estudo podem ser constituintes de compostos organometálicos presentes como impurezas do petróleo e são encontrados em efluentes originários da indústria de refino e química deste composto (DANTAS-NETO e GURGEL, 2013; SOUZA, 2012), sendo estas atividades realizadas próximas aos pontos P0 e P1.5. O padrão de circulação das águas superficiais da região, que ocorre no sentido Norte para Sul (Moacyr Araújo, dados não publicados), também é um fator que pode contribuir para as menores concentrações de contaminantes no P3.8 e para o maior acúmulo destes próximos aos pontos P0 e P1.5.

A adição de tiosulfato de sódio promoveu redução da toxicidade das amostras aos náuplios de *T. biminiensis*, exceto do ponto P3.8 em Abril. O tiosulfato é um agente redutor e sua presença pode reduzir a toxicidade causada por compostos oxidantes, a exemplo dos compostos clorados, ozônio, dióxidos, mono e dicloroaminas, brometos, iodetos, íons de manganês, alguns metais catiônicos e compostos orgânicos eletrófilos. Dentre os metais catiônicos, citam-se cádmio, chumbo, cobre, prata, mercúrio, selênio e zinco (HOCKETT e MOUNT, 1996; U.S. EPA, 2007; MATOS, 2011). Diante da redução da toxicidade das amostras após a manipulação com agente redutor, os compostos oxidantes são suspeitos de causarem toxicidade nas águas da região do complexo estuarino de Suape. Entretanto, são necessários mais estudos acerca da identificação e quantificação dos possíveis agentes tóxicos envolvidos.

As manipulações realizadas com zeólitas visaram reduzir a toxicidade relacionada à presença de amônia e/ou metais. As zeólitas podem remover metais em solução e a sequência de seletividade iônica, bem como a eficiência de adsorção e a capacidade de troca catiônica estão inteiramente relacionados à estrutura cristalina das zeólitas e as características químicas dos íons encontrados em solução (SHINZATO, 2007). As zeólitas também podem adsorver o nitrogênio amoniacal em matrizes aquosas (LIMA et al., 2008). Das amostras coletadas em Abril de 2013, apenas o P1.5 apresentou redução da toxicidade após manipulação com a zeólita Purina<sup>®</sup>, considerando o parâmetro de frequência de estágios de copepoditos, entretanto não houve diminuição da concentração de amônia não ionizada após esta manipulação. Não houve alteração da toxicidade do P3.8 após a manipulação, porém foi verificado aumento do teor de amônia não ionizada (Tabela 6.2). Em Setembro, foram empregadas zeólitas das marcas Multi e Purina que promoveram redução da toxicidade para os pontos P0 e P1.5, sendo observada redução dos níveis de amônia não ionizada após ambas manipulações no P1.5 e após a zeólita Purina no P0. A toxicidade do P3.8 aumentou após a manipulação com ambas as zeólitas (Tabela 6.3). Deste modo, indica-se a utilização de qualquer uma das duas marcas de zeólita para aplicação na manipulação de AIT e observa-se que o ponto P1.5 teve sua toxicidade reduzida após a aplicação deste tratamento para os dois períodos de coleta. Conforme discutido anteriormente, apesar das baixas concentrações de metais quantificadas nas amostras coletadas em Setembro, processos de interação entre os contaminantes podem ocorrer e promover toxicidade nas amostras relacionadas à presença de metais. Desta forma, a etapa de caracterização após as manipulações com as zeólitas indica que, em Abril, a toxicidade do ponto P1.5 pode ter relação com a presença de metais e que,

em Setembro, a toxicidade dos pontos P0 e P1.5 pode ter relação com a presença de metais e /ou amônia.

A amônia apresenta-se no ambiente aquático como sub-produto da excreção de animais e como resultado da decomposição bacteriana da matéria orgânica. Também pode ser resultante do lançamento de fertilizantes, de efluentes industriais e de esgotos domésticos (BAUMGARTEN et al., 1996). O Nitrogênio Amoniacal Total (NAT) pode estar presente na água sob duas formas dissolvidas: a amônia não-ionizada-NH<sub>3</sub> e o íon amônio-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, cujas proporções são muito variáveis no ambiente marinho e dependem do pH, da temperatura e da salinidade. A amônia não-ionizada (NH<sub>3</sub>) é considerada a forma mais tóxica para os organismos marinhos, enquanto que o íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é a forma mais utilizada pelo fitoplâncton. Vale ressaltar que em águas marinhas a forma predominante é a do íon amônio, considerando pH inferior a 9,5 (GRASSHOFF et al., 1983).

Aminot e Chaussepied (1983) consideram que águas costeiras não poluídas geralmente apresentam concentrações de íon amônio-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> abaixo de 0,014 mg L<sup>-1</sup>. Já para Day et al. (1987) apenas concentrações acima de 0,07 mg L<sup>-1</sup> caracterizam estuários poluídos. A legislação ambiental brasileira estabelece através da Resolução CONAMA n°357/2005 o limite de 0,40 mg L<sup>-1</sup> de NAT para águas salinas e salobras. A análise química da etapa de identificação indicou que os pontos estudados (*baseline* e após a manipulação com *Ulva* sp.) apresentaram teor de NAT muito abaixo destas concentrações (Tabela 6.12).

Para a amônia não-ionizada, a EPA (1989) indica que em média a exposição a concentrações superiores a 0,035 mg L<sup>-1</sup> seria suficiente para acarretar danos aos organismos marinhos. Utilizando a tabela que relaciona a concentração de NAT em função da temperatura, pH e salinidade das amostras (JOHANSSON e WEDBORG, 1980), estimou-se que os valores de amônia não-ionizada nas análises químicas (etapa de identificação) foram inferiores a 0,0003 mg L<sup>-1</sup> para todos os pontos estudados, considerando os resultados do *baseline* e após a manipulação com *Ulva* sp (Tabela 6.12). Entretanto, quando observados os valores estimados com o kit colorimétrico no dia dos testes de AIT constata-se que as concentrações desta substância para o *baseline* do P0 e P1.5 em Setembro (0,025 mg L<sup>-1</sup>) estavam próximas do nível capaz de causar toxicidade para organismos marinhos (Tabela 6.3). Foi observada redução na concentração do NAT para P0 e P1.5, após tratamento com *Ulva* sp. em ambos os métodos de análise. Desta forma, a amônia poderia ter relação com a toxicidade verificada nas amostras. Apesar da confiabilidade dos resultados obtidos pelo kit colorimétrico ser discutível, o fato da análise química de amônia (etapa de identificação) ter sido realizada com amostras estocadas/congeladas (*baseline* e após as manipulações) pode ter

acarretado diminuição da concentração deste composto devido à sua instabilidade, relatada pela UNESCO (1996).

Concentrações de  $0,16 \text{ mg L}^{-1}$  de amônia não-ionizada reduziram o crescimento de fêmeas do misidáceo *Mysidopsis bahia* (salinidade 30,5; pH 7,95; temperatura  $26,5^{\circ}\text{C}$ ) (EPA, 1989). Li (1997) em levantamento dos estudos de sensibilidade realizados para esta substância, observaram que copépodos, anfípodos e misidáceos apresentam  $\text{CL}_{50/96\text{h}}$  na faixa de  $0,82$  a  $1,54 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo considerados mais sensíveis a este composto do que moluscos e vertebrados marinhos. Alguns estudos acerca dos efeitos letais da amônia não-ionizada a copépodos marinhos foram realizados. Sullivan e Ritacco (1985) descrevem que a  $\text{CL}_{50/48\text{h}}$  para náuplios do copépodo da espécie *Acartia tonsa* variou entre  $0,14$  e  $0,21 \text{ mg L}^{-1}$  (pH 7,7 - 8,7, temperatura  $20^{\circ}\text{C}$ , salinidade 30-32). Araújo (2005) observou uma  $\text{CL}_{50/72\text{h}}$  de  $3,57 \text{ mg L}^{-1}$  ( $3,12 - 3,92$ ) para fêmeas do copépodo *T. biminiensis* (pH  $8,0 \pm 0,2$ , temperatura  $27,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , salinidade  $36 \pm 1$ ) e Souza et al. (2013) verificaram que a  $\text{CL}_{50/96\text{h}}$  para o copépodo *Nitocra* sp foi de  $1,70 \pm 0,97 \text{ mg L}^{-1}$  (pH 7,5-8,7, temperatura  $17-28^{\circ}\text{C}$ , salinidade 23 -27). Estes dados indicam maior tolerância de *T. biminiensis* à amônia não-ionizada, porém existe a necessidade de testes de toxicidade com estágios larvais e de avaliação de efeitos subletais, uma vez que a toxicidade da amônia pode ser diagnosticada pela redução do crescimento dos organismos aquáticos e não somente pela observação de efeitos letais (BOYD, 1998).

A manipulação com a macroalga *Ulva* sp. reduziu a toxicidade de todos os pontos coletados, exceto a do P1.5 do mês de Setembro. A macroalga *Ulva* sp. possui habilidade de absorver, armazenar e utilizar grandes quantidades de amônia, tendo sido empregada na limpeza de efluentes e água marinha (U.S.EPA, 1996; PELLETIER et. al, 2001). Além de reduzir a toxicidade devido à amônia, vários estudos vêm demonstrando que estas clorófitas também podem retirar alguns metais como Cádmiu, Cromo, Chumbo e Níquel de matrizes aquosas, funcionando como um bioindicador seletivo (KAMALA-KANNAN et al., 2008; RYBAK et al., 2012).

Num estudo de AIT utilizando o tratamento com *Ulva lactuca* em amostras de água intersticial, Pelletier et al. (2001) verificaram que a exposição à macroalga não afetou a concentração de compostos orgânicos das amostras, porém diminuiu levemente a concentração de metais e reduziu significativamente a toxicidade devido à amônia para anfípodos e misidáceos. Os autores concluíram que a absorção de amônia independe da presença de metais ou de contaminantes orgânicos nas amostras. Diante disto, nota-se que a amônia é considerada o principal composto afetado pela manipulação com a macroalga, seguida dos metais. Estes estudos corroboram a suspeita de que os metais, principalmente o

Fe, e a amônia estejam envolvidos com a toxicidade das amostras de água superficial de Suape.

A manipulação de 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 observada redução da toxicidade em todos os pontos estudados, exceto no P1.5 do mês de Abril, sugerindo que compostos susceptíveis a estes processos podem estar envolvidos com a toxicidade inicialmente verificada.

Burgess et al. (2003) realizaram um estudo comparando manipulações de AIT com aeração, *Ulva* sp. e zeólita na diminuição da concentração e redução da toxicidade causada por amônia utilizando amostras de água intersticial, sugerindo que as manipulações com *Ulva* sp. e com a zeólita apresentaram boa performance na redução da toxicidade para o anfípoda *Ampelisca abdita*, entretanto, para o misidáceo *Americamysis bahia* o tratamento com a macroalga foi considerado mais efetivo. Os autores ressaltaram que houve maior remoção da amônia no tratamento da aeração quando este foi utilizado em conjunto com o ajuste de pH 10, contudo, pouca amônia foi removida em pH em torno de 8.

A manipulação de pH pode gerar redução, perda ou aumento da toxicidade, fornecendo informações importantes acerca da natureza química do agente tóxico. Por exemplo, a amônia em pH básico apresenta-se na sua forma não-ionizada (mais tóxica que a forma do íon amônio, porém com maior volatilidade) e os sulfetos em pH ácido apresentam-se na forma de gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio (mais tóxica que a forma do íon hidrossulfeto, porém com maior volatilidade), nestas condições podem ser removidos nesta manipulação (U.S.EPA, 1991; 1996). As alterações de pH também podem afetar a toxicidade de muitos pesticidas ionizáveis e alterar a biodisponibilidade e toxicidade de alguns metais e surfactantes (MATOS, 2011). Neste estudo, a comparação da duração da manipulação do pH com as amostras coletadas em Setembro indicou que os resultados obtidos foram semelhantes, considerando todos os parâmetros ecotoxicológicos estudados. O ajuste realizado por 24 horas é muito laborioso devido à necessidade do monitoramento no decorrer da manipulação, sendo mais indicado o ajuste do pH das amostras por uma hora. Considerando que foram verificadas reduções da toxicidade em todos os pontos nos dois meses de coleta após o ajuste para pH 9, indica-se que substâncias degradadas/transformadas em pH básico estão mais associadas à toxicidade das amostras estudadas que as degradadas/ transformadas em pH ácido. Estas

últimas foram indicadas como suspeitas no P1.5 de Abril e nos P0, P1.5 em Setembro. A redução de pH pode aumentar a toxicidade de alguns metais, como Cu e Pb, e diminuir a toxicidade de outros, como Zn (U.S.EPA, 2007). Foi observada que a toxicidade do P3.8 não esteve relacionada a substâncias degradadas/ transformadas em pH ácido em nenhuma das coletas.

A manipulação de filtração pode sugerir que o agente tóxico tenha relação com o material particulado presente nas amostras. Embora o material particulado apresente, geralmente, menor biodisponibilidade que o material dissolvido, é importante salientar que a toxicidade também pode estar associada à ingestão de partículas pelos organismos (U.S.EPA, 2007). Nas amostras estudadas, observou-se que todas as amostras coletadas tiveram sua toxicidade reduzida após esta manipulação, exceto o P3.8 em Setembro. As amostras do mês de Abril, período chuvoso, estariam mais propícias a apresentarem maior teor de material particulado devido ao maior aporte de materiais transportados pelas chuvas. As áreas do P0 e do P1.5 são mais expostas à atividades de dragagens que também poderiam contribuir para aumento de partículas em suspensão.

A utilização de cartuchos de *clean up* é uma técnica indicada quando a toxicidade pode estar relacionada com a presença de compostos orgânicos apolares numa amostra. Compostos tóxicos apolares incluem hidrocarbonetos, metais quelados, agrotóxicos, dibenzodioxinas policloradas (PCDD, dioxinas), dibenzofuranos policlorados (PCDF, furanos), bifenilas policloradas (PCB), resinas, fármacos, etc. No presente estudo foram utilizados dois tipos de cartuchos, o de sílica C-18 e o polimérico, que estão entre os mais utilizados (CALDAS et al., 2011). Desta forma, este trabalho foi realizado na perspectiva de ampliar a possibilidade de constatar que compostos orgânicos poderiam ter relação com a toxicidade verificada nas águas da região de Suape. A manipulação com os dois tipos de cartuchos reduziu a toxicidade de todas as amostras analisadas nos dois períodos de coleta, evidenciando que os compostos orgânicos podem ser considerados um dos principais agentes causadores da toxicidade das águas da região.

Dentre as análises químicas relacionadas a estes compostos, foram analisados os HAPDDs e agrotóxicos. Os hidrocarbonetos no ambiente aquático podem ser oriundos de atividades antrópicas como exploração, produção e transporte de petróleo e derivados; processos de combustão, como queima de petróleo e de combustíveis fósseis; escoamento urbano; derrames de óleo, deposição atmosférica e lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados (UNEP, 1992; NCR, 2003). As análises dos HAPDDs em regiões costeiras são importantes, pois algumas moléculas apresentam potencial carcinogênico e

mutagênico para humanos e animais selvagens (WHO 1983; SAMIULLAH, 1985). Os HAPDDs estão relacionados com algumas alterações em crustáceos, como modificações fisiológicas e celulares em caranguejos (DISSANAYAKE e BAMBER, 2010) e mortalidade em larvas de camarões (BECHMANN et al., 2010). Bang et al. (2009) observaram os efeitos do hidrocarboneto benzo(a)pireno sobre o desenvolvimento, o crescimento e a morfologia do urossoma do copépodo harpacticóide *Tigriopus japonicus* utilizando o teste com placas multi-poços. Quando expostos a determinadas concentrações do composto, os copepoditos apresentaram maior tempo de desenvolvimento, menor crescimento (medido através de um programa analisador de imagens) e deformidades no urossoma.

O P0, localizado na Baía de Suape e próximo ao dique interno do porto e à área de lançamento de efluente de uma petroquímica, apresentou concentração média de HAPDDs inferior a da área de influência do rio Tatuoca. O P1.5 (rio Tatuoca) foi a área mais contaminada por HAPDDs, sendo esta região diretamente influenciada por atividades de estaleiro (onde produtos de petróleo, como lubrificantes, graxas e tintas contendo hidrocarbonetos são utilizados), por indústrias que descarregam seus efluentes no rio e por outras atividades localizadas na Baía de Suape, como navegação, dragagens e transporte de petróleo e derivados. O P3.8, sujeito a maior diluição gerada pelo aporte do Rio Massangana e localizado mais distante das atividades de SUAPE, apresentou a menor concentração de HAPDDs. É importante ressaltar a possível influência de fontes atmosféricas, como a fuligem de indústrias e a queima da cana-de-açúcar da região, bem como o aporte atmosférico advindo de centros urbanos adjacentes, sendo necessários mais estudos para inferir sobre as origens desta contaminação.

A presença de HAPDDs, mesmo em baixas concentrações, pode causar efeitos deletérios aos organismos aquáticos dependendo das propriedades físico-químicas específicas dos seus componentes e da sua capacidade de interferir nos sistemas biológicos (GESAMP, 1993). O método de fluorescência empregado para análise de HPA totais tem sido útil em regiões sujeitas a ações antrópicas e tem gerado resultados expressivos mesmo em baixas concentrações (ZANARDI et al., 1999a; ZANARDI et al., 1999b; BÍCEGO et al., 2009; LEMOS et al., 2014). O método fornece uma visão geral e qualitativa sobre a contaminação, servindo como base para realização de estudos futuros em pontos considerados críticos, porém são necessárias análises quantitativas acerca de quais os compostos podem estar presentes na água superficial de Suape.

Algumas concentrações de HAPDDs determinadas nas amostras de Suape (em eq. Criseno) estiveram acima do limite máximo estabelecido pela legislação ambiental

(CONAMA, 2005) que define a concentração máxima de  $0,018 \mu\text{g L}^{-1}$  de criseno para águas salinas de classe 1 destinadas para a pesca ou cultivo de organismos para consumo. Por se tratar de uma análise qualitativa, não é possível afirmar que as concentrações de HAPDDs determinadas nas amostras eram apenas do composto criseno, porém os resultados indicam que estes compostos encontram-se acima do limite permitido para todos os pontos estudados (Tabela 6.12).

Alguns trabalhos confirmam a elevada toxicidade de alguns hidrocarbonetos para crustáceos. Forget e Leray et al. (2005) demonstraram que os náuplios do copépodo calanóide *Eurytemora affinis* expostos a  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  de benzo(a)pireno cresceram mais lentamente quando comparados ao controle. Semelhantemente, Bang et al. (2009) reportaram que houve retardo do crescimento em náuplios do copépodo *Tigriopus japonicus* expostos a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  do mesmo composto. A base de dados da PAN (2014) relata que a  $CL_{50/96h}$  de benzo(a)antraceno foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para o microcrustáceo *Daphnia pulex*. Deste modo, dependendo do hidrocarboneto presente e da sua toxicidade, não se pode descartar a possibilidade de que estes compostos possam ter contribuído para a toxicidade aos náuplios de *T. biminiensis* expostos às amostras de água superficial coletadas em Suape.

Araújo-Castro (2008) analisou hidrocarbonetos em amostras de sedimento na região de Suape coletadas em 2003. A concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA totais no sedimento foi considerada baixa (variando entre 31 e  $1049 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) em comparação a outras regiões classificadas como poluídas. A autora relatou ainda que os compostos benzo(b)fluoranteno, fenantreno, fluoranteno, perileno, pireno foram os mais comuns em todas as amostras, sendo que o benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno e criseno apresentaram as concentrações médias mais elevadas. Estes resultados indicam que a região de Suape apresentou hidrocarbonetos classificados como altamente tóxicos para organismos aquáticos, como o benzo(a)antraceno, o benzo(a)pireno e o benzo(b)fluoranteno.

Em estudo mais recente realizado na mesma região, Lemos et al. (2014) coletaram amostras de água em vários pontos nos períodos chuvoso (Agosto de 2011) e seco (Fevereiro de 2012) e verificaram que no período chuvoso, em geral, as concentrações de HAPDDs foram menores, variaram entre  $0,02 - 0,77 \mu\text{g L}^{-1}$  (eq. criseno), que no período seco, que foram de  $0,01 - 1,39 \mu\text{g L}^{-1}$  (eq. criseno), sugerindo que o aumento das descargas de água doce no período de chuvas aumentaria o processo de diluição dos contaminantes. Os autores informam que a concentração de HAPDDs no ponto próximo ao Porto de Suape apresentou, por outro lado, concentração mais elevada no período chuvoso, possivelmente associada à intensa navegação e às constantes operações de dragagem que ocorrem na área, contudo o

estuário de Suape apresentou concentrações menores de HAPDDs que áreas intensamente poluídas. Entretanto afirmam que a introdução constante destes compostos pode ocasionar contaminação crônica, levando a problemas futuros para a biota e à saúde humana.

Os agrotóxicos não foram detectados ( $< 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) nas amostras coletadas neste estudo o que, a princípio, sugeriria que os agrotóxicos não seriam os responsáveis pela toxicidade verificada. No entanto, sugere-se a realização de novas análises destes produtos com técnicas amostrais mais apropriadas (maior volume da amostra) e etapas de pré-concentração, pois estas substâncias encontram-se bastante diluídas em amostras de água e podem estar presentes na região porquanto a principal fonte de agrotóxicos para o meio aquático é a atividade de agricultura que, na região costeira de Pernambuco, é bem representada pela cultura da cana-de-açúcar (GUNKEL et al., 2006). Brown et al. (2003) afirmam que alguns agrotóxicos podem interferir no desenvolvimento de copépodos, aumentando o tempo de desenvolvimento dos náuplios.

Apesar de ter tornado o ensaio mais laborioso, a adição dos parâmetros ecotoxicológicos de crescimento no teste com náuplios de *T. biminiensis* empregado no estudo de AIT permitiu a obtenção de respostas mais sensíveis em relação à observação da redução da toxicidade após as diferentes manipulações utilizadas. Lesueur et al. (2013) observaram que os parâmetros de crescimento dos náuplios foram mais sensíveis que a mortalidade num estudo de avaliação da toxicidade de diferentes compostos orgânicos, incluindo alguns hidrocarbonetos, aos náuplios do copépodo calanóide *Eurytemora affinis*. Os autores sugerem que estes parâmetros podem ser utilizados na avaliação da toxicidade de amostras ambientais.

O desenvolvimento e o crescimento dos copépodos são processos regulados por hormônios, entretanto, pouco se sabe acerca do sistema endócrino dos invertebrados (PORTE et al., 2006). Estudos realizados com crustáceos indicam que existem hormônios responsáveis pela regulação das mudas, os ecdiesteróides, e pelo controle da metamorfose, hormônio juvenil (JH). Também podem ocorrer distúrbios dos mecanismos necessários ao crescimento, como interações com receptores ou modificações da atividade de enzimas (LAUFER e BORST, 1988; ANDERSEN et al., 2001; OECD, 2006). Estes processos podem ser inibidos ou alterados por várias substâncias, mesmo em baixas concentrações, como os metais (BROWN et al., 2005; POYNTON et al., 2007), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (FORGET-LERAY et al., 2005; BANG et al., 2009); os agrotóxicos (BROWN et al., 2003, CHANDLER et al., 2004; FORGET-LERAY et al., 2005; Di MARZIO et al., 2013) e os

hormônios (ANDERSEN et al., 2001; HUTCHINSON et al., 2002; FORGET-LERAY et al., 2005).

As baixas concentrações determinadas para a maioria das substâncias químicas pesquisadas neste trabalho remetem a possíveis processos de interação que podem ocorrer entre os contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes numa amostra ambiental, ainda mais considerando que se trata de uma área que está sob influência de grandes empreendimentos com elevados potenciais poluidores. Os efeitos tóxicos das amostras coletadas para a biota podem ser reflexos de interações sinérgicas, aditivas, antagônicas ou de potenciação que podem ocorrer entre diferentes contaminantes presentes na água. A exposição resultante da mistura de contaminantes presentes numa amostra pode acarretar uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente daquela esperada pela ação dos contaminantes sozinhos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Dos contaminantes pesquisados, os hidrocarbonetos e os metais, como o Fe, parecem ter ligação com a toxicidade das amostras. Os resultados das análises químicas confirmaram que mais de um composto está relacionado com a toxicidade presente nas amostras de água superficial de Suape, sendo necessárias análises de outros compostos que também podem estar interferindo na toxicidade da água na região, bem com a utilização de outras técnicas analíticas e de preparo de amostra.

Os dados dos testes de toxicidade corroboram estudos anteriores obtidos para amostras de água superficial (ARAÚJO e SOUZA-SANTOS, 2013; SOUZA-SANTOS e ARAÚJO, 2013), demonstrando que os contaminantes também são introduzidos através dos rios, enfatizando a necessidade de melhorias de tratamento de efluentes das diversas indústrias localizadas na região e de um monitoramento constante das condições ambientais. Os resultados da AIT forneceram uma visão da complexidade de interpretar os dados de AIT envolvendo amostras marinhas onde misturas de substâncias desconhecidas podem estar presentes (MACKEN et al., 2009). Dentre as manipulações empregadas no presente estudo, as Colunas Polimérica e C-18 e a *Ulva* sp. foram as que, em geral, mais promoveram redução da toxicidade das amostras, considerando os diferentes parâmetros ecotoxicológicos. Aliando a estes os resultados obtidos na ACP, os compostos orgânicos, os metais, mais especificamente o Fe, e a amônia não-ionizada parecem estar mais fortemente envolvidos com a toxicidade das amostras de água superficial de Suape. Estes dados sugerem que futuros estudos de AIT com amostras de água da região podem ser aprofundados tendo estes compostos como principais agentes tóxicos suspeitos.

É importante mencionar que estudos de AIT podem incluir adaptações das fases e utilização de novas técnicas visando realizar a correta identificação do agente tóxico, uma vez que procedimentos de AIT podem criar artifícios que conduzem a conclusões errôneas. Estudos posteriores podem incluir adaptações das manipulações do estudo de AIT através da utilização de manipulações conjugadas visando estreitar a lista dos agentes suspeitos de causar toxicidade numa amostra, possibilitando uma avaliação mais direcionada para classes de compostos indicadas em estudos iniciais. Estas manipulações sequenciais são realizadas quando existem suspeitas acerca do agente tóxico ou do grupo responsável pela toxicidade de uma amostra. Outro fato importante é que a realização da AIT não constitui uma prova irrefutável de que determinado agente é o responsável pela toxicidade de uma amostra, pois existem vários fatores que podem gerar variações nos resultados, principalmente aqueles relacionados às interferências das próprias manipulações e ao fato de uma manipulação reduzir ou remover mais de uma classe de compostos (BADARÓ-PEDROSO e RACHID, 2002).

## 5.6 Conclusões

Diante destes resultados, conclui-se que a toxicidade das amostras coletadas em Suape é variável e bastante complexa, fato que pode ser atribuído à diversidade de atividades realizadas na área, às diferentes influências sofridas pelos pontos estudados e ao regime de chuvas e das marés. A toxicidade das amostras de água superficial de Suape aos náuplios de *T. biminiensis* pode ser atribuída a substâncias pertencentes a diferentes grupos químicos e às várias relações e efeitos que estas podem apresentar quando presentes simultaneamente no ambiente. Todavia, os compostos orgânicos, os metais, mais especificamente o Fe, e a amônia não-ionizada parecem estar mais fortemente envolvidos com a toxicidade das amostras de água superficial de Suape.

A toxicidade verificada nas amostras, bem como a redução das mesmas, indica que os agentes tóxicos podem ser de diferentes origens. Trata-se do primeiro trabalho de AIT realizado na região de Suape, cujos estudos necessitam ser aprofundados com a utilização de amostras de outros compartimentos ambientais, bem como utilização de outras técnicas analíticas e de preparo de amostra para fornecer mais informações a cerca das possíveis causas da toxicidade da região do complexo estuarino de Suape.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O estudo das condições do teste com os náuplios do copépodo *T. biminiensis* forneceu um protocolo prático, rápido e de baixo custo. O teste de curta duração com parâmetros letais e subletais apresenta uma variação aceitável e os náuplios de *T. biminiensis* são tão sensíveis ao sulfato de zinco quanto outras espécies de copépodos utilizados em ensaios de toxicidade.

O ensaio com náuplios de *T. biminiensis* pode ser utilizado na avaliação de amostras de água marinha e estuarina. A adição de novos parâmetros de comprimento dos copepoditos e de observação dos estágios de desenvolvimento contribui para aumento da sensibilidade do teste, porém é necessário avaliar sua utilização diante do aumento de trabalho. Os parâmetros mais sensíveis foram inibição, desenvolvimento, comprimento total, relação C/T, comprimento médio total por estágio, seguidos do comprimento da cabeça, comprimento médio da cabeça por estágio e frequência de estágio. O protocolo estabelecido por Lavorante et al. (2013) apresenta sensibilidade semelhante e pode ser executado diante da necessidade de um teste mais rápido.

A região de Suape encontra-se comprometida ambientalmente, com ocorrência de toxicidade sub-letal mais associada ao início do período seco. Estudos de monitoramento ecotoxicológico são necessários para se conhecer as possíveis substâncias relacionadas com a toxicidade da região e para subsidiar medidas de controle, ações preventivas e corretivas no tocante às tomadas de decisão e gestão ambiental. A toxicidade das amostras de água superficial estudadas é variável e bastante complexa, fato que pode ser atribuído à diversidade de atividades realizadas na área de Suape, às diferentes influências sofridas pelos pontos estudados e ao regime de chuvas. Substâncias pertencentes a diferentes grupos químicos podem estar envolvidas com esta toxicidade, e as várias relações e os efeitos que estas podem apresentar quando presentes simultaneamente no ambiente devem ser considerados.

O estudo de AIT indica que os compostos orgânicos, os metais, mais especificamente o Fe, e a amônia não-ionizada parecem estar mais fortemente envolvidos com a toxicidade das amostras de água superficial de Suape. A redução da toxicidade verificada nas amostras de água de Suape indica que os agentes tóxicos podem ser de diferentes origens, sendo indicadas principalmente as manipulações envolvendo as colunas polimérica e de C-18, a filtração, a *Ulva* sp e tiosulfato de sódio. Trata-se do primeiro trabalho de AIT realizado na região de Suape cujos estudos necessitam ser aprofundados possibilitando uma avaliação mais direcionada para classes de compostos indicadas no presente estudo. Estes estudos podem

utilizar amostras de outros compartimentos ambientais, bem como manipulações conjugadas e outras técnicas analíticas visando a obtenção de informações acerca das possíveis causas da toxicidade da região e futuras consequências para a biota marinha e para saúde humana.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS – CPRH.

*Diagnóstico Socioambiental e Zoneamento Ecológico Econômico Costeiro do Litoral Sul de Pernambuco*. Recife, 1999.

AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS – CPRH.

*Relatório de monitoramento da qualidade da água de Bacias Hidrográficas do*

*Estado de Pernambuco em 2006*. Recife, 2006. Disponível: <[http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/bacias\\_hidrograficas/relatorio\\_bacias\\_hidrograficas/39737%3B62704%3B170203%3B0%3B0.asp](http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/bacias_hidrograficas/relatorio_bacias_hidrograficas/39737%3B62704%3B170203%3B0%3B0.asp)> Acesso em: 01 jun. 2014.

AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS – CPRH.

*Diagnóstico do turismo nos municípios de Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca e São*

*José da Coroa Grande. Relatório Final*. Fev, 2003. 76 p. Disponível em: <<http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/PNMA2/diagnostico-turismo/turismo-capitulo1.pdf>> Acesso em: 02 jul. 2014.

AGENCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMAS-APAC. Índice pluviométrico.

Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>> Acesso em: 10 jun. 2014.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22st Edition. Washington: APHA, 2012

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. *Standard Guide for Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod*. ASTM (E2317-04), 2004.

AMIARD, J.-C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), v. 76, n. 2, p. 160–202, 2006.

AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. Brest, C.N.E.X.O., 1983. 376p.

ANDERSEN, H. R.; WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Development of copepod nauplii to copepodites--a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, v. 20, n. 12, p. 2821–9, 2001.

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.

ARAÚJO, R J. V. *Tolerância do Copepoda Tisbe biminiensis à amônia em testes agudos*. Apresentada como monografia de especialização em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

ARAÚJO, R J. V. *Avaliação toxicológica do Complexo Estuarino de Suape – PE utilizando o pluteus do ouriço-do-mar Lytechinus variegatus Lamarck (1816)*. Apresentada como dissertação de mestrado em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

ARAÚJO, R. P. A; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; SILVÉRIO, P. F. et al. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, v. 25, n. 2, p. 581–8, 2006.

ARAÚJO, C. V. M.; DIZ, F. R.; LAIZ, I. et al. Sediment integrative assessment of the Bay of Cádiz (Spain): an ecotoxicological and chemical approach. *Environment International*, v. 35, n. 6, p. 831–41, 2009.

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.; SOUZA-SANTOS, L. Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 327, p. 58–69, 2005.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; COSTA, M. F. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do porto de SUAPE utilizando o copépedo bentônico *Tisbe biminiensis* nos períodos seco e chuvoso. In: *RELINE – Resíduos líquidos do nordeste*.

*Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo – 1ª Coletânea de trabalhos técnicos*. Recife: Ed. Universitária de UFPE. p. 47–60, 2006.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. *O copépodo marinho bentônico Tisbe biminiensis como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos*. Apresentada como tese de doutorado em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; TORREIRO, A. G. A. G. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate. *Brasilian Journal of Oceanography*, v. 57, n. 1, p. 33–41, 2009.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. A.; OLIVEIRA, D. D.; SOUZA-SANTOS, L. P.; COSTA, M. F.; CARREIRA, R. S.; REZENDE, C.E.; MARQUES, J. S. J. Avaliação da toxicidade dos sedimentos no entorno do porto de Suape (Pernambuco) utilizando o copépodo *Tisbe biminiensis*. In: M. K. Kato; S. Gavazza; E. A. P. Gonçalves; L. Florencio. (Org.). *Gestão e Tratamento de Resíduos Líquidos Gerados na Cadeia Produtiva do Petróleo*. II Coletânea de Trabalhos Técnicos. 1. ed. Olinda: Livro Rápido, 2013a, v. 1, p. 1–32.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. A.; TORREIRO, A. G. A. G.; GARCIA, K. S.; SOUZA-SANTOS, L. P. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do estuário do rio São Paulo (Bahia) utilizando o copépodo *Tisbe biminiensis* e a PL do camarão *Litopenaeus vannamei*. In: M. K. Kato; S. Gavazza; E. A. P. Gonçalves; L. Florencio. (Org.). *Gestão e Tratamento de Resíduos Líquidos Gerados na Cadeia Produtiva do Petróleo*. II Coletânea de Trabalhos Técnicos. 1 ed. Olinda: Livro Rápido, 2013b, v. 1, p. 33–57.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT. *NBR 15469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro, 2007. 7 p.

BADARÓ-PEDROSO, C.; SANTOS, M. C. F.; CARR, R. S. Utilization of a marine TIE study to characterize toxicants in produced water samples. In: V ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA - ECOTOX, 1998, Itajaí. *Anais... Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil*, 1998. p. 73.

BADARÓ-PEDROSO, C. *Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas*. São Carlos-SP. Apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 1999.

BADARÓ-PEDROSO, C.; SANTOS, M. C. F.; CARR, R. S.; MELO, S. L. R.; RACHID, B. R. F. Determinação das condições de uso do EDTA, tiossulfato de sódio e da alga *Ulva* sp em estudos de identificação da toxicidade de efluentes salinos. In: VI ENCONTRO DE ECOTOXICOLOGIA e III REUNIÃO SETAC LATINO-AMERICA, 2000, São Carlos, SP. *Resumos...* 2000. p. 127–127.

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.

BADARÓ-PEDROSO, C.; OLIVEIRA, L. M. C. Aplicação da fase I do estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (TIE) de um efluente industrial utilizando o teste embriolarval com *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea). In: VII ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA - ECOTOX, 2004.

BADARÓ-PEDROSO, C.; BARROS, J. Fase I do estudo de avaliação e identificação da toxicidade (AIT) de amostras de água do estuário de Santos-SP utilizando-se o teste embriolarval com *Lytechinus variegatus*. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 2005, Vitória. *Anais...* 2005.

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.

BANG, H. W.; LEE, W.; KWAK, I. S. Detecting points as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus* sensu lato, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere*, v. 76, n. 10, p. 1435–9, 2009.

BAPTISTA-NETO, J. A.; PONZI, V. R. A. & SICHEL, S. E. (Orgs.). 2004. *Introdução à Geologia Marinha*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 279 p.

BARATA, C.; MEDINA, M.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 43, n. 3, p. 373–8, 2002.

BARBOSA, D. S. Avaliação e Identificação de Toxicidade da água e sedimento de nascentes do Rio Mogi. São Carlos-SP. Apresentada como dissertação de Mestrado, Universidade de São Carlos, 2010.

BARKA, S.; PAVILLON, J.; AMIARD, J. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology: C*, v. 128, n. 4, p. 479–93, 2001.

BAUMGARTEN, M. G. Z; ROCHA, J. M. B; NIENCHESKI, L. F. H. *Manual de Análises em Oceanografia Química*. Rio Grande: Ed. FURG, 1996. 132p.

BAUMGARTEN, M. G.; NIENCHESKI, L. F. Avaliação da qualidade hidroquímica da área portuária da cidade do Rio Grande. *Série Documentos Técnicos nº 9 / Oceanografia – FURG*. Ed. FURG, 1998. 66 p.

BECHMANN, R. K. Use of life tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird). *Environmental Toxicology Chemistry*, n. 13, v. 9, p. 1509–1517, 1994.

BECHMANN, R. K. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Science of the Total Environment*, v. 233, n. 1–3, p. 33–46, 1999.

BECHMANN, R. K.; LARSEN, B. K.; TABAN, I. C.; HELLGREN, L. I.; MØLLER, P.; SANNI, S. Chronic exposure of adults and embryos of (*Pandalus borealis*) to oil causes PAH accumulation, initiation of biomarker responses and an increase in larval mortality. *Marine Pollution Bulletin*, v. 60, p. 2087–2098, 2010.

BIALES, D. A.; KOSTICH, M.; BURGUESS, M. R.; HO, K. T.; BENCIC, D. C.; FLICK, R. L.; PORTIS, M. L.; PELLETIER, M. C.; PERRON, M. M.; REISS, M. Linkage of Genomic Biomarkers to Whole Organism End Points in a Toxicity Identification Evaluation (TIE). *Environmental Science Technology*, n. 47, p. 1306–1312, 2013.

BIANCHINI, A.; MARTINS, S. E.; PEDROSO, M. S.; SAID, J. S.; SPENGLER, A. Biotic ligand model in fresh and sea water in Brazil. In: LAGOS, G. E.; WARNER, A. E. M.; SÁNCHEZ, M. (Eds.) *Health, environment and sustainable development*, v. 2. Santiago, p. 543–552, 2003.

BÍCEGO, M.C.; ZANARDI-LAMARDO, E.; TANIGUCHI, S.; MARTINS, C.C.; DA SILVA, D.A.M.; SASAKI, S.T.; ALBERGARIA-BARBOSA, A.C.R.; PAOLO, F.S.; WEBER, R.R.; MONTONE, R.C. Results from a 15-year study on hydrocarbon concentrations in water and sediment from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, n. 21, p.209-220, 2009.

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. *Resumos...* 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.

BOYD, C. E. Gerenciamento da qualidade da água e aeração no cultivo do camarão marinho. *Associação Brasileira dos Criadores de Camarão-ABCC*, Tradução e impressão AQUATEC e MCR, 1998. 157p.

BROWN, R. J.; RUNDLE, S. D.; HUTCHINSON, T. H.; WILLIAMS, T. D.; JONES, M. B. A microplate freshwater copepod bioassay for evaluating acute and chronic effects of chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 1528–1531, 2005.

BURATINI, S. V.; ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A.; PRÓSPERI, V. A.; WERNER, L. I. Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, n. 3, p. 257–262, 2007.

BURGESS, R. M.; SCHWEITZER, K. A.; MCKINNEY, R. A. Contaminated marine sediments: water column and interstitial toxic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 12, p. 127–138, 1993.

BURGESS, R. M.; TAGLIABUE, M. D. Toxicity characterization of an industrial and municipal effluent discharging to the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 30, n. 8, p. 524–535, 1995.

BURGESS, R. M.; PELLETIER, M. C.; HO, K. T.; et al. Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: A comparison of *Ulva lactuca*, zeolite and aeration methods. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, n. 5, p. 607–618, 2003.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CAMARGO-SOUZA, R.; POLEZA, F.; MÁXIMO, M. V.; RESGALLA, C. Utilização de larvas do cirripedia *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) como organismo-teste na avaliação de toxicidade aguda. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, n. 2, p.7–14, 2007.

CARR, R. S.; NIPPER, M. Development of marine sediment toxicity data for ordnance compounds and toxicity identification evaluation studies at select naval facilities. *Report prepared for Naval Facilities Engineering Service Center*, Port Hueneme: California, 1999. 205p.

CARR, R. S.; NIPPER, M.; BIEDENBACH, J. M.; HOOTEN, R. L.; MI, K. Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine sites suspected of ordnance contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 41, p. 298–307, 2001.

CASTRO, P. & HUBER, M. F. *Marine Biology*. Fourth Edition, New York: The McGraw–Hill Companies, 2003. 462 p.

CHAGAS, A. C. O. Níveis de metais pesados e hidrocarbonetos em sedimentos do Complexo Industrial de Suape–PE–Brasil. Recife-PE. Apresentada como dissertação de mestrado em Oceanografia Abiótica. Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L.; KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*)

development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 1, p. 117–124, 2004.

COELHO, P.A.; BATISTA-LEITE, L.M.A.; SANTOS, M.A.C.; TORRES, M.F.A. O manguezal. In: ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S.; COSTA, M. F. (Org.). *Oceanografia: um cenário tropical*. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Oceanografia, Recife, 2004, p.641-687.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO -CETESB. *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. São Paulo, 2005. v. 1. Disponível em <[www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35...-/relatorios](http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35...-/relatorios)>. Acesso em: 01 jun. 2014.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO-CETESB. *Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos*. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão et al. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 326 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO-CETESB. *Informações Toxicológicas*. 2012. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/109-informacoes-oxicologicas>>. Acesso em: 01 jun. 2014.

COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS – CPRM. Serviço Geológico do Brasil. *Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea*. Diagnóstico do município de Ipojuca, estado de Pernambuco / Organizado por João de Castro Mascarenhas, Breno Augusto Beltrão, Luiz Carlos de Souza Junior, Manoel Julio da Trindade G. Galvão, Simeones Neri Pereira, Jorge Luiz Fortunato de Miranda. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. *Resolução n° 357, de 17 de março de 2005*. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 11 jul. 2014.

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.

- COSTA, B. V. M.; CASTRO, C. M. V. A.; TORREIRO A. G.; GARCIA K.; SOUZA-SANTOS, L P. Efeito da aplicação de fertilizantes na biorremediação da toxicidade de sedimento sob influência de atividades petrolíferas na Baía de Todos os Santos (Bahia- Brasil) simulação em laboratório. In: MESSIAS, A. S.; COSTA, M. R. N. (Org.). *Gestão Integrada de Ambientes Costeiros e Impactos Ambientais*. 1 ed. Recife: UNICAP, v. 1, p. 81-91. 2009.
- COULL, B.C.; CHANDLER, T. Pollution and meiofauna- field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 30: 191-271, 1992.
- DAHL, U.; LIND, C. R.; GOROKHOVA, E.; EKLUND, B.; BREITHOLTZ, M. Food quality effects on copepod growth and development: implications for bioassays in ecotoxicological testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, p. 351–7, 2009.
- DANTAS NETO, A.V.; GURGEL, A. *Refino de Petróleo e Petroquímica*. 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível em: <http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/deq0370/Curso de Refino de Petroleo e Petroquimica.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2014.
- DAY–JR., J. W.; HALL, C. A. S.; KEMP, W. M.; YANEZ-ARANCIBIA, A. *Estuarine Ecology*. John Wiley & Sons, 1987. 557p.
- DI MARZIO, W. D.; CASTALDO, D.; DI LORENZO, T.; DI CIOCCIO, A.; SÁENZ, M. E.; GALASSI, D. M. P. Developmental endpoints of chronic exposure to suspected endocrine-disrupting chemicals on benthic and hyporheic freshwater copepods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 96, p. 86–92, 2013.
- DIAS, J. A.; CARMO, J.A.; POLETTE, M. As Zonas Costeiras no contexto dos Recursos Marinhos. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, v. 9, n. 1, p. 3-5, 2009.
- DIAZ, R. J.; ROSENBERG, R. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science*, v. 321, p. 926, 2008.
- DISSANAYAKE, A.; BAMBER, S. D. Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). *Marine Environmental Research*, n.70, p.65–72, 2010.

DIZ, F. R.; ARAÚJO, C. V. M.; MORENO-GARRIDO, I.; HAMPEL, M.; BLASCO, J. Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: lethal and reproductive endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 7, p. 1881–6, 2009.

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.

ENVIRONMENT CANADA. *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*. EPS 1/RM/12. Environmental Canada, 1990

FADE/UFPE. *Refinaria do Nordeste – Abreu e Lima*. RIA. 2006, 77 p.

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.; RAMOS, C. A. C.; BARBOSA, D. F.; MELO, A. V. O. M.; PINTO, S. L.; VERÇOSA, M. M.; OLIVEIRA, D. A. S.; FRANCISCO, J. A. Zonación vertical del macrobentos de sustratos sólidos del estuario del río Massangana, Baía de Suape, Pernambuco, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 9, n. 1, 2009.

FERRAZ, M. A.; CHOUERI, R. B.; ALVES, A. V. Avaliação e identificação da toxicidade de amostra de água intersticial do emissário submarino de Santos (SP), Brasil. *BioScience*, v. 1, p. 16–21, 2012.

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). Apresentada como dissertação de mestrado em Ecologia, Universidade Santa Cecília, 2013.

FERNANDES, L. M. B. *Estudos toxicológicos na área do complexo industrial portuário de Suape (PE)*. Convênio Complexo Industrial de Suape - Fundação Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Oceanografia-Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1999. 60p.

FORGET, J.; PAVILLON, J. F.; MENASRIA, M. R.; BOCQUENÉ, G. Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the

metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos and malathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 40, n. 3, p. 239–44, 1998.

FORGET-LERAY, J.; LANDRIAU, I.; MINIER, C.; LÉBOULENGER, F. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, n. 3, p. 288–94, 2005.

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

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UM/UNEP). Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. Rep. Stud. *GESAMP*, 50, 1993. 180p.

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.

GOVERNO DE PERNAMBUCO. Secretaria de Desenvolvimento Econômico. *Complexo Industrial Portuário de Suape. Histórico*. Disponível em: <<http://www.suape.pe.gov.br/institucional/historic.php>>. Acesso em: 02 jul. 2014.

GOURMELON, A.; AHTIAINEN, J. Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances- the OECD perspective. *Ecotoxicology*, v. 16, n. 1, p. 161–7, 2007.

GOUVEIA, E.L. *Aspectos Ambientais e Gestão dos Recursos Hídricos no litoral sul da Região Metropolitana do Recife RMR: o caso da Microrregião de Suape*. Apresentada como dissertação no Mestrado em Geografia, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

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.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Org.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York: Plenum Press, p. 26–60, 1975.

- GUNKEL, G.; KOSMOL, J.; SOBRAL, M.; ROHN, H.; MONTENEGRO, S.; AURELIANO, J. Sugar cane industry as a source of water pollution- case study on the situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil. *Water Air Soil Pollut*, v. 180, n. 1–4, p. 261–269, 2006.
- HACK, L. A.; TREMBLAY, L. A.; WRATTEN, S. D.; FORRESTER, G.; KEESING, V. Zinc sulfate and atrazine toxicity to the marine harpacticoid copepod *Robertsonia propinqua*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 42, n. 1, p. 93–98, 2008.
- HAGOPIAN-SCHLEKAT, T.; CHANDLER, G. T.; SHAW, T. J. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, n. 51, p. 247–264, 2001.
- HAMILTON, M. A.; RUSO, R. C.; THURSTON, R. V., Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science. Technology*, v. 11, n. 714–719, 1977.
- 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.
- 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.; HUIHUA, S.; XU, T.; CUI, Y.; YANG, L.; JIN, H.; WANG, L. Application of toxicity identification evaluation procedures to an effluent from a nitrogenous fertilizer plant in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, n. 2, p. 223–226, 2003.
- 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.

- 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.
- HOOK, S. E.; FISHER, N. S. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. *Marine Environmental Research*, v. 53, n. 2, p. 161–74, 2002.
- HUANG, Y.; ZHU, L.; LIU, G. The effects of bis(tributyltin) oxide on the development, reproduction and sex ratio of calanoid copepod *Pseudodiaptomus marinus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, n. 69, p. 147–152, 2006.
- HUTCHINSON, T. H.; WILLIAMS, T. D.; EALES, G. J. Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Marine Environmental Research*, v. 38, p. 275–290, 1994.
- HUTCHINSON, T. H.; POUNDS, N. A.; HAMPEL, M.; WILLIAMS, T. D. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *Science of the Total Environment*, v. 233, p. 167–179, 1999.
- HUTCHINSON, T. H. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters*, v. 131, n. 1–2, p. 75–81, 2002.
- IHARA, P. M.; PINHO, G. L. L.; FILLMANN, G. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 5, n. 1, p. 27–32, 2010.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO-IPA. Cana-de-acúcar. Disponível em: <http://www.ipa.br/resp20.php>. Acesso em: 08 ago 2014.
- ISO 14669. *Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)*. 1 Ed. International Organization for Standardization Switzerland, 1999.
- 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.

- JOHANSSON, O.; WEDBORG, M. The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25°C. *Journal Solution Chemistry*, v. 9, p. 37–44, 1980.
- JORGE, R. A. D. L. V. C.; MOREIRA, G. S. Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 61, n. 2, p. 280–5, 2005.
- KAMALA-KANNAN, S.; PRABHU DASS BATVARI, B.; LEE, K. J.; KANNAN, N.; KRISHNAMOORTHY, N. R.; SHANTHI, K.; JAYAPRAKAS, M. Assessment of heavy metals (Cd, Cr and Pb) in water, sediment and seaweed (*Ulva lactuca*) in the Pulicat Lake, South East India. *Chemosphere*, v. 71, n. 7, p. 1233–40, 2008.
- 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.
- KITZMANN, D.; ASMUS, M. Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades. *Revista de Administração Pública*, Rio de Janeiro, 6 ed, 2006.
- KOENING, M. L.; ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S.; MACÊDO, S. J. Impactos da construção do porto de Suape sobre a comunidade fitoplanctônica no estuário do rio Ipojuca (Pernambuco-Brasil). *Acta Botanica Brasilica*, v.16, n. 4, p. 407–420, 2002.
- KOENING, M. L.; LEÇA, E. E.; NEUMANN-LEITÃO, S.; MACÊDO, S. J. Impact of the construction of the Port of Suape on phytoplankton in the Ipojuca river estuary (Pernambuco – Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, n. 46, p. 73–81, 2003.
- KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology (London, England)*, v. 16, n. 1, p. 183–95, 2007.
- 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.
- KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; BAO, V. W. W.; LEE, J.-S. Copper toxicity in the marine copepod *Tigriopus japonicus*: low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Marine Pollution Bulletin*, v. 57, n. 6–12, p. 632–6, 2008.

- LAUFER, H.; BORST, D. W. Juvenile hormone in crustacea. In: LAUFER, H. and DOWNER, R. G. H. (eds.), *Invertebrate endocrinology*, v. 2, *Endocrinology of selected invertebrate types*, p. 305–313. Alan R. Liss, Inc., New York, New Jersey. 1988.
- LARRAIN, A.; SOTO, E.; SILVA, J.; BAY-SCHMITH, E. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to  $K_2Cr_2O_7$  under varying temperature regimes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 3, n. 61, p. 391–396, 1998.
- 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.
- LAWS, E. D. *Aquatic Pollution: an introductory text*. v. 8. New York: John Wiley & Sons, p. 199-273, 2000.
- LEBLANC, GERALD A.; MCLACHLAN, JAMES B. Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, n. 7, p. 1450–1455, 1999.
- LEBRET, L. J. *Estudo sobre desenvolvimento e implantação de indústrias, interessando a Pernambuco e ao Nordeste*. 3 ed. rev. Recife: Condepe, 2001, 118 p.
- LEMO, R. T. D. O.; DE CARVALHO, P. S. M.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Marine Pollution Bulletin*, v. 82, n. 1–2, p. 183–8, 2014.
- LESUEUR, T.; BOULANGÉ-LECOMTE, C.; XUEREB, B.; et al. Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 94, p. 60–6, 2013.
- LI, X. The toxicity of ammonia to atlantic silverside (*Menidia menidia*) and ghost shrimp (*Palaemonetes pugio*). M.S. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA. 1997.
- LIMA, R. M. G.; WILDHAGEN, G. R. S.; CUNHA, J. W. S. D.; AFONSO, J. C. Remoção do íon amônio de águas produzidas na exploração de petróleo em áreas offshore por adsorção em clinoptilolita. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1237–1242, 2008.

LOCATELLI, C.; TORSI, G. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, n. 509, v. 1, p. 80–89, 2001.

LOTUFO, G.; FLEEGER, J. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, n. 151, p. 91–102, 1997.

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

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.

MACKEN, A.; GILTRAP, M.; FOLEY, B.; McGOVERN, E.; McHUGH, B.; DAVOREN, M. An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: application of porewater Toxicity Identification Evaluation (TIE) to Irish marine sediments. *Environment International*, v. 35, n. 1, p. 98–106, 2009.

MARQUES, J. S. J.; RANGEL, T. P.; BRITO, F. P.; et al. Geoquímica de Metais em Sedimentos da Zona Estuarina do Complexo Industrial Porto de Suape, PE - Brasil. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, v. 11, n. 4, p. 379–387, 2011.

MATOS, M. F. Avaliação e identificação da toxicidade de amostras de água e sedimento do Reservatório de Funil, RJ. Itajubá-MG. Apresentada como dissertação de mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Itajubá, 2011

MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. Age-and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 42, n. 1, p. 17–22, 2002.

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.
- MENDONÇA, V. S. *Avaliação da toxicidade aguda de efluentes industriais do Riacho algodoais*. Recife: CPRH, 2005. 22 p.
- MILIOU, H.; VERRIOPOULOS, G.; MAROULIS, D.; BOULOUKOS, D. Influence of life-history adaptations on the fidelity of laboratory bioassays for the impact of heavy metals ( $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$ ) on tolerance and population dynamics of *Tisbe holothuriae*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 4, 2000.
- MILLER, S. A. & HARLEY, J. P. *Zoology*. 3 Ed. United States: WCB Publishers, 1996.
- MEC (MINERALS EDUCATION COALITION). *Minerals Database*. Disponível em: <<http://www.mineralseducationcoalition.org/minerals>>. Acesso em: 01 jun. 2014.
- MOHAMMED, E. H.; WANG, G.; XU, Z.; LIU, Z. Physiological response of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* experimentally exposed to cadmium. *AAEL Bioflux*, v. 4, n. 1, p. 99–107, 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.
- MOREIRA, L. B. *Avaliação da toxicidade dos sedimentos e macrofauna bentônica em áreas portuárias: Porto do Mucuripe e Terminal Portuário do Pecém (CE); e Porto de Santos (SP)*. Apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2009. 134 p.
- NILIN, J. *Avaliação da qualidade do sedimento do estuário do rio Ceará*. 2008. Fortaleza-CE. Apresentada como dissertação no Mestrado em Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará, 2008
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE M. H.; READMAN, J. W. & LEONARD, D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 552, p. 247–268, 2004.

MUNIZ, K.; NETO, B. B.; MACÊDO, S. J.; PINHEIRO FILHO, W. C. Hydrological Impact of the Port Complex of Suape on the Ipojuca River (Pernambuco – Brazil). *Journal of Coastal Research*, v. 21, n. 5, p. 909–914, 2005.

MURTI, R.; SHUKLA, G. S. Toxicity of copper sulphate and zinc sulphate to *Macrobrachium lamarrei* (Decapoda). *Crustaceana*, v. 47, p. 168–173, 1984.

NRC (National Research Council). *Oil in the Sea – Inputs, Fates and Effects*, 2th ed. Washington: National Academy Press, 2003.

NEUMANN-LEITÃO, S. *Impactos antrópicos na comunidade zooplancônica estuarina. Porto de Suape-PE-Brasil*. Apresentada como tese de doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, 1994. 273 p.

NEUMANN, V. H.; MEDEIROS, C.; PARENTE, L.; LEITÃO, S. N.; KOENING, M. L. Hydrodynamism, Sedimentology, Geomorphology and Plankton Changes in the Suape Area (Pernambuco – Brazil) after a Port Complex Construction. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 70, p. 313–323, 1998.

NIPPER, M. G.; BADARÓ-PEDROSO, C.; JOSÉ, V. F.; MELO, S. L. Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Mysids and copepods. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, n. 1, p. 99–106, 1993.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas*, v. 21, n. 2, p. 7–18, 2008.

OLIVEIRA, D. D. *Avaliação da Sensibilidade do copépodo Tisbe biminiensis para testes toxicológicos em água e sedimentos estuarinos*. Recife-PE. Apresentada como dissertação no Mestrado em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Detailed Review Paper on Aquatic Arthropods in Life Cycle Toxicity Tests with an Emphasis on Developmental, Reproductive and Endocrine Disruptive Effects. *Series on Testing and Assessment*, n. 55. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2006. 125 p.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Report of progress on the interlaboratory validation of the OECD harpacticoid copepod development and reproduction

test. *Series on Testing and Assessment*, n. 158. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2011. 53 p.

PELLETIER, M. C.; HO, K. T.; CANTWELL, M.; et al. Use of *Ulva lactuca* to identify ammonia toxicity in marine and estuarine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, v. 20, n. 12, p. 2852–9, 2001.

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.

PESSOA, V. T.; NEUMANN-LEITÃO, S.; GUSMÃO, L. M. O.; SILVA, A. P.; PORTO-NETO, F. F. Comunidade zooplancônica na baía de suape e nos estuários dos rios Tatuoca e Massangana, Pernambuco (Brasil). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 4, n. 1, 2009.

PAN (PESTICIDES ACTION NETWORK). *Pesticide Database*. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org/>>. Acesso em: 01 jul 2014.

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.

PINTO, C. S. C.; JORGE, P.; SANTOS, P. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, n. 198, p. 253–267, 2001.

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.

PIRES, L. E. B. *Avaliação e Identificação da Toxicidade (Toxicity Identification Evaluation - TIE) do efluente líquido do pólo industrial de Belford Roxo, RJ e sua contribuição na qualidade das águas do curso inferior do Rio Sarapuú, sub-bacia do rio Iguaçu, bacia da Baía da Guanabara*. Rio de Janeiro-RJ. Apresentada como tese de doutorado em Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2006.

POLEZA, F. *Avaliação da qualidade do sedimento do baixo estuário do rio Itajaí-Açu (SC) através de testes de toxicidade crônica*. 2010. Apresentada como dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, 2010.

PORTE, C.; JANER, G.; LORUSSO, L. C.; et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology: C*, v. 143, n. 3, p. 303–15, 2006.

POYNTON, H. C.; VARSHAVSKY, J. R.; CHANG, B.; et al. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environmental Science and Technology*, v. 41, n. 3, p. 1044–50, 2007.

PRITCHARD, D.W. What is an estuary physical viewpoint. In: LAUFF, G. H. (Ed.) *Estuaries*. Washington D.C.: American Association for the Advancement of Science, 1967.

PRÓSPERI, V. A.; NIPPER, M. G.; VALERIA, S. Desenvolvimento de metodologia de cultivo e testes de toxicidade com organismos marinhos. In: Relatório Técnico da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (SP). CETESB: 028755-028756. 1994.

QUEVAUVILLER, P. H.; COFINO, W.; VIJVERBERG, A.; WELLS, D. E.; GRIEPINK, B. Quality assurance in marine monitoring. In: QUEVAUVILLER, P., ed. Quality assurance in marine monitoring programmes: report and programme: proceedings of the workshop held in Noordwijkerhout. 21-23 de maio de 1990. [S.l.]: Commision of the European Communities, 1992. 43p.

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.

RAISUDDIN, S.; KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; SCHLENK, D.; LEE, J.-S. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), v. 83, n. 3, p. 161–73, 2007.

- RESGALLA-Jr., C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Técnicas Facimar*, v. 6, p.153–163, 2002.
- RESGALLA, C.; POLEZA, F.; SOUZA, R. C.; MÁXIMO, M. V.; RADETSKI, C. M. Evaluation of effectiveness of EDTA and sodium thiosulfate in removing metal toxicity toward sea urchin embryo-larval applying the TIE. *Chemosphere*, v. 89, n. 1, p. 102–7, 2012.
- RIAL, M. F. P. *Cidade – Porto: Dinâmicas espaciais e planejamento intra-urbano*. Apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2008.
- RIBEIRO, A. C. B.; SOUZA-SANTOS, L. Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. *Aquaculture*, v. 321, p. 280–288, 2011.
- RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A.; FINGERMAN, M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comparative biochemistry and physiology: Part A, Molecular and integrative physiology*, v. 146, n. 4, p. 661–71, 2007.
- ROSSATO, M.; IHARA, P.M.; ÁVILA, T.R.; RESGALLA, C.; FILLMANN, G.; PINHO, G.L.L. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos. *Biologist*, n.7, p. 1–2, 2009.
- RYBAK, A.; MESSYASZ, B.; ŁĘSKA, B. Freshwater *Ulva* (Chlorophyta) as a bioaccumulator of selected heavy metals (Cd, Ni and Pb) and alkaline earth metals (Ca and Mg). *Chemosphere*, v. 89, n. 9, p. 1066–76, 2012.
- SAIZ, E.; MOVILLA, J.; YEBRA, L.; BARATA, C.; CALBET, A. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), v. 157, n. 4, p. 1219–26, 2009.
- SALE, P. F.; BUTLER, M. J.; HOOTEN, A. J.; KRITZER, J. P.; LINDEMAN, K. C.; MITCHESON, Y. J. S.; STENECK, R. S.; VAN LAVIEREN, H. *Stemming Decline of the Coastal Ocean: Rethinking Environmental Management*, Hamilton, Canada. 2008.
- SAMIULLAH, Y. Biological effects of marine oil pollution. *Oil Petrochemical Pollution*, n. 2, p. 235–264, 1985.
- SANTORE, R. C.; MATHEW, R.; PAQUIN, P. R.; DITORO, D. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia*

*magna. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: C*, v. 133, n. 1–2, p. 271–85, 2002.

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

SHINZATO, M.C. Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. *Revista do Instituto Geológico*, v. 27–28, n. 1/2, p. 65–78, 2007.

SILVA, A.P.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SCHWAMBORN, R.; GUSMÃO, L.M.O.; SILVA, T.A. Mesozooplankton of an impacted bay in North Eastern Brazil. *Brazilian Archives Biology and Technology*, n. 47, p. 485–493, 2004.

SMITH, S.; FURAY, V. J.; LAYIWOLA, P. J.; MENEZES-FILHO, J. A. Evaluation of the toxicity and quantitative structure - activity relationships (QSAR) of chlorophenols to the copepodid stage of a marine copepod (*Tisbe battagliai*) and two species of benthic flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and sole (*Solea solea*). *Chemosphere*, v. 28, n. 4, p. 825–836, 1994.

SOUZA, F. B. *Remoção de metais de efluentes petroquímicos por adsorção, bioadsorção e sistemas emulsionados*. Apresentada como tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

SOUZA-SANTOS, L.P.; R.J. ARAÚJO. Water toxicity assessment in the Suape estuarine complex (PE–Brazil). *Ecotoxicology Environmental Contamination*, v. 8, n. 1, p. 59–65, 2013.

STRINGER, T. J.; GLOVER, C. N.; KEESING, V.; NORTHCOTT, G. L.; TREMBLAY, L. A. Development of a harpacticoid copepod bioassay: selection of species and relative sensitivity to zinc, atrazine and phenanthrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 80, p. 363–71, 2012.

STROM, D.; RALPH, P. J.; STAUBER, J. L. Development of a toxicity identification evaluation protocol using Chlorophyll-*a* fluorescence in a marine microalga. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 56. p. 30–38. 2009.

STUM, W.; MORGAN, J. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. New York: John Wiley & Sons, 1981.

SULLIVAN, B. K.; RITACCO, P. J. *Marine Ecosystems Research Laboratory*, Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, U.S.A., v. 7, p. 205–217, 1985.

SUNDA, W. G.; TESTER, P. A.; HUNTSMAN, S. A. Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Marine Biology*, v. 94, p. 203–210, 1987.

TAYLOR, R. L.; CALDWELL, G. S.; OLIVE, P. J. W.; BENTLEY, M. G. The harpacticoid copepod *Tisbe holothuriae* is resistant to the insidious effects of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 413, p. 30–37, 2012.

TEÓDULO, M. J. R.; LIMA, E. S.; NEUMANN, V. H. M. L.; LEITE, P. R. B.; SANTOS, M. L. F. Comparação de métodos de extração parcial de metais traço em solos e sedimentos de um estuário tropical sob a influência de um complexo industrial portuário, Pernambuco Brasil. *Estudos Geológicos*, v. 13, 2003.

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.

TORREIRO, A. G. A. G. Toxicidade e biorremediação em sedimento contaminado, utilizando o copépedo harpacticóide *Tisbe biminiensis*. 2010. Apresentada como dissertação de Mestrado em Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA-440/5-88-004: *Ambient aquatic life water quality criteria for ammonia (salt water)*. 1989. 66p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. EPA-600/6-91/003: *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations - Phase I: Toxicity Characterization Procedures* (second edition), 1991.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA.

*EPA/600/6-91/005F: Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents - Phase I*, 1992.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA. Acid digestion of aqueous samples and extracts for total metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy. METHOD 3010A. 1992.

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. Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry – method 525, Cincinnati, 1995. 60 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA.

*EPA/600/R-096/054: Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE)*, Guidance Document, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U. S. EPA.

*EPA/600/R-07/080: Sediment Toxicity Identification Evaluation: Phases I, II and III*. Guidance Document, 2007.

UNEP/IOC/IAEA. Determination of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, n. 20, 1992. 75p.

UNITED NATIONS. *World Population to 2300*. United Nations, Department of Economic and Social Affairs. New York, United States, 2004.

UNESCO/WHO/UNEP (UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED

NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. 2nd Edition, p. 64–94, 1996.

VERRIOPOULOS, G.; HARDOUVELIS, D. Effects of sublethal concentration of zinc on survival and fertility in four successive generations of *Tisbe*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 19, n. 4, p. 162–166, 1988.

VERRIOPOULOS, G.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. Toxicity of zinc to the marine copepod *Tisbe holothuriae*; The importance of the food factor. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 118, n. 3, p. 457–463, 1989.

VIGANO, L.; ARILIO, A.; FALUGIL, C.; MELODIA, F. & POLESELLO, S. Biomarkers of exposure and effect in Flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, n. 10, p. 887–894, 2001.

VOLKMANN-ROCCO, B., *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) new species of the gracilis group. *Archives Oceanography Limnology*, v. 8, p. 71–90, 1973.

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.

WILLIAMS, T. D.; JONESA, M. B. Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 183, p. 283–298, 1994.

WILLIAMS, T.; JONES, M. Effects of temperature and food quantity on the reproduction of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 236, n. 2, p. 273–290, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization*. 1983. 477p.

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.

ZAGATTO P. A.; BERTOLETTI E. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Paulo: Editora RIMA. 2006. 478p.

ZANARDI, E.; BICEGO, M.C.; MIRANDA, L.B.; WEBER, R.R. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 38, n. 4, p. 261–267. 1999a.

ZANARDI, E.; BICEGO, M.C.; MIRANDA, L.B.; WEBER, R.R. Dissolved/dispersed Petroleum Aromatic Hydrocarbons in the São Sebastião Channel, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 38, n. 5, p. 410–413, 1999b.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 3ed. New Jersey: Prentice Hall. 1996. 121p.

ZHANG, L. J.; YING, G. G.; CHEN, F.; ZHAO, J. L.; WANG, L.; FANG, Y. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 377–386, 2012.

**ANEXO**

---

## Anexo 1

### **Relação dos agrotóxicos analisados nas amostras de água superficial de Suape coletadas em Setembro de 2013.**

Acephate, Acetamiprid, Aldicarb, Aldicarb sulfone, Aldicarb sulfoxide, Aldrin, Allethrin, Ametryn, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Azoxystrobin, Binfenethrin, Bioallethrin (1,2), Bitertanol, Boscalid, Bromopropylate, Bromuconazole, Buprofezin, Captan, Carbaryl, Carbendazim (Benomyl, Thiophanate-Methyl), Carbofenothion, Carbofuran, Carbosulfan, Chlordane, Chlorfenapyr, Chlorfenvinphos, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Clofentezine, Clothianidin, Cyfluthrin (1,2,3,4), Cymoxanil, Cypermethrin (1,2,3,4), Cyproconazole, Cyprodinil, Cyromazine, Dazomet, DDT total, Deltamethrin, Diazinone, Dichlofluanid, Dichlorvos, Dicofol, Dieldrin, Difenconazole (1,2), Dimethoate, Dimethomorph, Diniconazole, Disulfoton, Diuron, Dodemorph, Endosulfan alpha, Endosulfan beta, Endosulfan sulfate, Endrin, Epoxiconazole, Esfenvalerate, Ethiofencarb, Ethiofencarb sulfone, Ethiofencarb sulfoxide, Ethion, Ethoprophos, Etofenprox, Etrinfos, Famoxadone, Fenamiphos, Fenarimol, Fenazaquin, Fenhexamid, enitrothion, enpropathrin, Fenpyroximate, Fenthion, Fenthion Sulfoxide, Fenvarelate, Fipronil, Fluazifop-P-butyl, Flusilazole, Flutriafol, Folpet, Fosthiazate, Furathiocarb, HCB, HCH (alpha, beta e delta), Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexaconazole, Imazalil, Imidacloprid, Iprodione, Iprovalicarb, Kresoxim-methyl, Lambda-cyhalothrin, Lindane, Linuron, Malaoxon, Malathion, Metalaxyl, Metconazole, Methamidophos, Methidathion, Methiocarb, Methiocarb sulfoxide, Methomyl, Mevinphos (cis and trans), Mirex, Monocrotophos, Myclobutanil, Nuarimol, Oxadixyl, Oxyfluorfen, Paclobutrazol, Paraoxon-ethyl, Parathion-ethyl, Parathion-methyl, Penconazole, Pencycuron, Permethrin (cis and trans), Phenthoate, Phorate, Phosalone, Phosmet, Pirimicarb, Pirimicarb-desmethyl, Pirimiphos-ethyl, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Propargit, Propiconazole (1 e 2), Propoxur, Pyraclostrobin, Pyrazophos, Pyridaben, Pyridaphenthion, Pyrifenoxy, Pyrimethanil, Pyriproxifen, Quintozene, Spinosad (A e D), Spiroxamine, Tebuconazole, Tebufenpyrad, Terbufos, Tetraconazole, Tetradifon, Thiabendazole, Thiachloprid, Thiametoxam, Thiobencarb, Thiodicarb, Triadimefon, Triadimenol, Triazophos, Trichlorfon, Trifloxystrobin, Triflumizole, Trifluralin, Vamidothion, Vamidothion sulfone e Vamidothion.