

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CÉLIO FREIRE MARIZ JR

**Diagnóstico ecotoxicológico do Rio Ipojuca utilizando
estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio
rerio* (Hamilton, 1822)**

RECIFE

2021

Célio Freire Mariz Jr

**Diagnóstico ecotoxicológico do Rio Ipojuca utilizando
estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio
rerio* (Hamilton, 1822)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Animal

Orientador: **Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

RECIFE

2021

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Mariz Jr, Célio Freire

Diagnóstico ecotoxicológico do Rio Ipojuca utilizando estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822) / Célio Freire Mariz Jr – 2021.

164 f.: il., fig., tab.

Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2021. Inclui referências e anexos.

1. Peixe 2. Toxicidade- testes 3. Rios I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orient.) II. Título

597

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-047

CÉLIO FREIRE MARIZ JR

**Diagnóstico ecotoxicológico do Rio Ipojuca utilizando
estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio
rerio* (Hamilton, 1822)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: 15/ 02/ 2021

Prof. Dra. Mônica Lúcia Adam (1º Titular)
Departamento de Zoologia – (UFPE/CAV)

Prof. Dra. Sávia Gavazza dos Santos
Pessoa (3º Titular)
Departamento de Engenharia Civil –
(UFPE)

Prof. Dra. Lilia Pereira de Souza Santos (2º
Titular)
Departamento de Oceanografia – (UFPE)

Prof. Dr. João Lucas Leão Feitosa
(Suplente interno)
Departamento de Zoologia – (UFPE)

Prof. Dra. Eliete Zanardi Lamardo (Suplente Externo)
Departamento de Oceanografia – (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente as pessoas mais próximas no âmbito familiar que inclui meus pais Célio Mariz e Glaucia Souza, minha irmã Hayane Mariz, meu sobrinho Ruan Mariz e meu namorado Matheus Assunção. Aos meus familiares e namorado atribuo este agradecimento principalmente pela manutenção da minha saúde mental que sabidamente pode ser bastante comprometida durante uma pós-graduação. Ou seja, muito se suaviza entre conversar, abraços e amor dentro desse meio.

Gostaria de agradecer ao pessoal do LABECOTOX que me ajudou bastante em muitos dos meus experimentos e em especial minha companheira de rio, Maria Gabriella Neri. Minha amiga da vida Maria Alves que também foi importantíssima no meu crescimento como pessoa e como profissional, visto que aprendemos muito juntos. Meu amigo Romulo Nepomuceno que me escuta reclamar de todo mundo e auxiliou não só nesta pós-graduação.

Esse tópico especial vai para meu excelentíssimo orientador do qual tenho muito apreço por inúmeras coisas, mas principalmente por segurar as barras da pós-graduação junto comigo, além de ser um grande amigo. Quero salientar que apesar dos perrengues que passamos juntos nesse final de curso, estresses, prazos, preocupações financeiras e mais estresse é muito bom e satisfatório fazer parte deste grupo de pesquisa que cresce. Muito disso é encabeçado por ele que leva nosso laboratório com muita animação, sorriso no rosto e ideias malucas, mas muito boas.

Meus agradecimentos também à professora Eliete Zanardi da Oceanografia por ter me orientado com minhas leituras de HPA e juntamente com ela a doutoranda Roxanny que também me auxiliou no processamento das amostras.

RESUMO

O Rio Ipojuca recebe descargas de efluentes domésticos, agrícolas e industriais em diferentes pontos ao longo de seu curso. A agência ambiental CPRH monitora a qualidade das águas em 14 estações ao longo de seu curso sendo que sete destas são o foco deste trabalho. Este trabalho avaliou a ecotoxicidade das águas superficiais e sedimentos aquáticos para estágios embriolarvais do peixe *Danio rerio*. Foram quantificadas taxas de mortalidade, efeitos no desenvolvimento embriolarval, frequências de anormalidades morfológicas e biomarcadores bioquímicos e comportamentais. Além disso, foi avaliada a toxicidade da amônia não ionizada (NH_3) na forma pura para o *D. rerio*, para poder inferir sobre a contribuição de NH_3 na toxicidade das amostras ambientais. As águas superficiais apresentaram elevada toxicidade ao *D. rerio*, expressa por significativos atrasos no desenvolvimento embriolarval, altas frequências de anormalidades morfológicas, diminuição de frequência cardíaca e efeitos comportamentais nas estações IP38, IP49 e IP55. As estações IP85 e IP90 apresentaram toxicidade intermediária baseada nestes mesmos parâmetros, seguidas das estações IP64 e IP01, que apresentaram toxicidade baixa ou ausente. As águas superficiais da estação IP49 a jusante da cidade de Caruaru apresentaram o maior potencial tóxico para embriões de *D. rerio*, e foram avaliadas amostras adicionais a montante e no meio da cidade incluindo elutriato de sedimentos aquáticos. Na estação IP49 diluições de 25% das águas superficiais e 6,25% dos elutrios de sedimento ainda apresentaram toxicidade significativa para a maioria dos parâmetros avaliados. Tanto nas amostras de água superficial quanto nas amostras de elutriato as concentrações de NH_3 foram significativas e provavelmente contribuíram para a toxicidade destas amostras ambientais. A concentração de NH_3 que causa 95% de mortalidade ao *D. rerio* após exposição embriolarval por 96 horas ($\text{LC}_{95}\text{-NH}_{3_{96\text{h}}}$) é igual a $2,99 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Foi verificada 100% de mortalidade de *D. rerio* exposto a águas superficiais ou elutrios da estação IP49 com concentração menor ou igual a $1,42 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, indicando que NH_3 isoladamente não explica a mortalidade verificada, e outras moléculas presentes na mistura complexa destas amostras ambientais contribuíram também para a toxicidade detectada. Foi verificada A avaliação das águas superficiais e do elutriato evidenciou um gradiente de toxicidade que variou de ausente ou baixa a montante da cidade de Caruaru para mortalidade total ou subletalidade significativa a jusante de Caruaru. Efeitos tóxicos subletais significativos foram verificados em *D. rerio* expostos a águas superficiais e elutrios da estação IP49, incluindo efeitos adversos na frequência cardíaca, ausência de pigmentação, atrasos no desenvolvimento embriológico e neurotoxicidade em

diluições de até 6,25% do elutriato. Este estudo demonstrou a alta toxicidade a jusante da cidade de Caruaru e a necessidade de ser caracterizar melhor as moléculas desconhecidas causadoras desta toxicidade. Além disso, evidenciou a aplicabilidade de estágios embriolarvais do *D. rerio* para o monitoramento de águas e sedimentos de rios tropicais.

Palavras chave: Peixes. Biomonitoramento. Ecotoxicologia. Desenvolvimento. Biomarcadores. Comportamento.

ABSTRACT

The Ipojuca River receives discharges of domestic, agricultural and industrial effluents at different points along its course. The environmental agency CPRH monitors water quality at 14 stations along its course, seven of which are the focus of this work. This work evaluated the ecotoxicity of surface waters and aquatic sediments for embryo stages of fish *Danio rerio*. Mortality rates, effects on embryo development, frequencies of morphological abnormalities and biochemical and behavioral biomarkers were quantified. In addition, the toxicity of non-ionized ammonia (NH₃) in pure form for *D. rerio* was evaluated, in order to infer about the contribution of NH₃ in the toxicity of the environment. High surface waters have high toxicity to *D. rerio*, expressed by evidence on embryo development, high frequencies of morphological abnormalities, decreased heart rate and behavioral effects at stations IP38, IP49 and IP55. IP85 and IP90 stations of intermediate toxicity based on the same parameters followed by stations IP64 and IP01, which low low or no toxicity. The surface waters of the IP49 station downstream of the city of Caruaru dissipate the greatest toxic potential for *D. rerio* embryos, and were assessed additional received upstream and in the middle of the city including elutriate of aquatic sediments. At the IP49 station, dilutions of 25% of the surface water and 6.25% of the sediment elutriates still dissipated toxicity for most of the adopted parameters. Both in surface water and elutriate water from NH₃ were supplied and probably contributed to the toxicity of these environments. The concentration of NH₃ that causes 95% mortality to *D. rerio* after embryo exposure for 96 hours (LC₉₅-NH₃_{96h}) is equal to 2.99 mg NH₃ L⁻¹. It was verified 100% of mortality of *D. rerio* exposed to surface waters or elutriates of the IP49 station with a concentration less than or equal to 1.42 mg NH₃ L⁻¹, indicating that NH₃ alone does not explain the verified mortality, and other molecules present in the mixture environmentally complicated mess also contributed to a detected toxicity. The assessment of surface water and elutriate was found to show a toxicity gradient that ranged from absent or low upstream of the city of Caruaru to total mortality or legal subletality downstream of Caruaru. Sublethal toxic effects were observed in *D. rerio* exposed to surface waters and IP49 season elutriates, including adverse effects on heart rate, absence of pigmentation, delay in embryological development and neurotoxicity in dilutions of up to 6.25% of the elutriate. This study contains the high toxicity downstream of the city of Caruaru and the need to be better characterized as unknown molecules that cause this toxicity. In addition, it showed the applicability of *D. rerio* embriolarval stages for the monitoring of tropical river waters and sediments.

Keywords; Fish. Biomonitoring. Ecotoxicology. Development. Biomarkers. Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

- Figura 1- Destacamento da calda do *Danio rerio* durante entre 12 hpf e 72 hpf evidenciando A- organismo em torno de 10 hpf; B- Organismos com cerca de 16 hpf; C-Organismos com cerca de 24 hpf; D- organismo com cerca de 48 hpf e D- Organismo com cerca de 72 hpf.....28
- Figura 2- Região dorsal do *Danio rerio* com setas evidenciando os somitos já se diferenciando em Miótomos (Originando a musculatura dorsal) e Esclerótomo (Originará as vertebras em volta da notocorda); A notocorda em si destacada pela seta preta e as células sanguíneas em evidência.....29
- Figura 3- Desenvolvimento do olho do *Danio rerio* até as 96 hpf. Imagem A- Estrutura ocular em formação por volta de 13 hpf; B- Globo ocular formado por volta de 24 hpf; C- Globo ocular formado e pigmentado por volta de 48 hpf e D- Globo ocular formado e bem pigmentado ao final das 96 hpf.....29
- Figura 4- *Danio rerio* entre 24 e 96 hpf com as imagens de A-F evidenciando o progresso na quantidade de massas pigmentares escuras em todo o comprimento larval e nos olhos.....31
- Figura 5- Progresso do desenvolvimento da nadadeira peitoral entre os momentos 48, 72 e 96 hpf no embrião larva de *Danio rerio*.....31
- Figura 6- Atribuição do desenvolvimento da boca no *Danio rerio*. A boca na posição zero faz o organismos receber a pontuação 0, enquanto que o organismo com 72 hpf e com o desenvolvimento normal recebe pontuação 1 pois a boca está na altura da parte posterior do olho e em 96 hpf o aparato mandibular eleva a boca a pontuação 2.32
- Figura 7- Extensão do saco vitelínico e espaço para insuflamento da bexiga em organismos saudáveis no período entre as 72 e 96 hpf. A- 96hpf o vitelo está na altura no coração e B- 72 hpf vitelo excede a linha do coração evidenciado pela seta preta.....33

Figura 8- <i>Danio rerio</i> saudável com 96 hpf, as setas em branco evidenciam a bexiga natatória. A- Organismos com bexiga natatória insuflada e bem aparente B- Organismo com bexiga não insuflada.....	34
Figura 9- Mapa evidenciando as estações de coleta da CPRH utilizadas neste trabalho ao longo do Rio Ipojuca.....	36
Figura 10- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados os principais para monitoramento ambiental segundo Agência de Proteção ambiental Americana (USEPA).....	41
Figura 11- Gráfico evidenciando o processo de especiação da amônia total a partir de sua fração em água em detrimento das variações de pH em água doce, segundo Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA).	42
Figura 12 - Emissário de esgoto doméstico desaguando no rio Ipojuca na região do município de Caruaru, próximo ao ponto conhecido como IP49 pela CPRH.....	43
Figura 13- Esquema evidenciando os processos de defesa antioxidante e dano a membrana fosfolipídica. Defesa não enzimática (DNE) representada por proteína não enzimática e vitaminas, Vitaminas (Vit.). Membrana fosfolipídica (Membrana FP).....	45

Manuscrito I

Figura 1 - Estações de coleta de água superficial do Rio Ipojuca utilizadas neste trabalho, parte da Rede de Monitoramento de Qualidade de Águas da Agência Ambiental de Pernambuco (CPRH).....	64
Figura 2- Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de <i>Danio rerio</i> expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca. Painéis A: (Kruskall Wallis, $H = 57,1$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$); B: (ANOVA, $F = 2,7$, $p = 0,017$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$); C: (Kruskall Wallis, $H = 65,5$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$): maio de 2018, outubro de 2018 e novembro de 2018, respectivamente. C: controle, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.4: Amostras de água diluídas 25%; IP49.8: Amostra diluída 12,5%; IP49.16: Amostra diluída 6,25% e IP49.32: Amostra diluída 3,13%.....	73

Figura 3- Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de *Danio rerio* expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca. Painéis

A: (Kruskall Wallis, $H = 66,5$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$);

B: (Kruskall Wallis, $H = 91,3$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$);

C: (Kruskall Wallis, $H = 73,0$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$): maio de 2019, outubro de 2019 e novembro de 2019, respectivamente. C: controle, IP38.2, IP49.2 e IP55.2: amostras diluídas 50%; IP49.3: amostra diluída 33,3% e IP49.4: Amostras de água diluídas 25%.....74

Figura 4- Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* ($n = 10$) expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca em novembro de 2019

(ANOVA, $F = 20,8$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$). C: controle, IP49.3: amostras de água diluídas 33%.....78

Figura 5- Quadro de gráficos da velocidade natatória espontânea média expressa em (cm s^{-1}). Análise realizada com as diferentes estações de coleta do rio Ipojuca nos anos de 2018 e 2019, utilizando larvas 8 dias pós fertilizados.

A: Amostras de T1 (Kruskal–Wallis, $H = 14,38$ $p = 0,013$, Dunn $p < 0,05$);

B: Amostras de T2 (ANOVA, $F = 4,64$, $p \leq 0,001$, 0,94, Dunnett $p < 0,05$);

C: Amostras de T3 (ANOVA, $F = 4,18$, $p \leq 0,001$, 0,96, Dunnett $p < 0,05$);

D: Amostras de T4 (Kruskal–Wallis, $H = 27,29$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);

E: Amostras de T5 (ANOVA, $F = 10,4$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

F: Amostras de T6 (ANOVA, $F = 10,13$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$). IP38.2: amostra diluída 50%; IP49.4: amostras de água diluídas 25%; IP49.8: Amostras de água diluídas 12,5%; IP49.16: Amostras de água diluídas 6,25 IP49.32: Amostra diluída 3,13%; IP49.3: Amostra diluída 33%.....80

Figura 6- Fração do tempo total de 300s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas expostas à água superficial das estações de coleta do Rio Ipojuca se mantiveram em repouso (retângulo preto), em natação lenta (retângulo branco), ou em natação rápida (retângulo cinza).....82

Figura 7- Quadro de gráficos com fração do tempo total de 300s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas expostas à água superficial das estações de coleta do Rio Ipojuca estiveram em

A: Sem movimentação repouso (ANOVA, $F = 220,06$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

B: Tempo em que estiveram em movimentação lenta (ANOVA, $F = 79,73$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$)

C: Tempo em que as larvas estiveram com movimentação rápida (ANOVA, $F = 594,5$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).....83

Figura 8- Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias após a fertilização (dpf) expostas a água superficial de estações de coleta do Rio Ipojuca e a água controle (C). Painéis;

A: (Kruskal–Wallis, $H = 34,47$, $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);

B: (ANOVA, $F = 3,105$, $p = 0,018$, Dunnett $p < 0,05$);

C: (ANOVA, $F = 6,104$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$): agosto de 2018, novembro de 2018 e novembro de 2019, respectivamente. IP49.3: Amostra diluída 33%; IP49.4: amostra diluída 25%; IP49.8: amostras de água diluídas 12,2%; IP49.16: Amostras de água diluídas 6,25% e IP49.32: Amostras de água diluídas 3,13%.....85

Figura 9- Atividade das enzimas Glutathione-S-transferase (GST) e (n = 7,3 ± 0,8) Acetilcolinesterase (AChE) (n = 4 ± 0)

(ANOVA, $F = 4,11$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunnett $p < 0,05$);

(ANOVA, $F = 2,35$, $p = 0,038$, Dunnett, $p < 0,05$) em pool de larvas inteiras de *Danio rerio* após 7 dias de exposição às águas superficiais de diferentes estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca em agosto de 2019. C: controle, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.4: Amostras de água diluídas 25%; IP55.2: amostras de água diluída 50%.86

Manuscrito II

Figura 1- Taxa de mortalidade para a fase embriolarval de *Danio rerio* exposto por 96h a diferentes concentrações de NH_3 , e ajuste dos dados segundo o modelo logístico.....107

Figura 2- Índice de desenvolvimento morfológico “GMS” da fase embriolarval de *Danio rerio* exposto durante 96 h a concentrações crescentes de NH_3 (Kruskal-Wallis $H = 126,86$ $p \leq 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).....108

Figura 3- Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n = 10) expostas a concentrações crescentes de NH_3
48 hpf: (ANOVA $F = 16,689$ $p < 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$)
72 hpf: (Kruskal-Wallis $H = 61,85$ $p \leq 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).....111

Figura 4- Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias pós fertilização (dpf) após exposição a concentrações crescentes de NH_3 .

	(Kruskal-Wallis $H = 47,699$; $p \leq 0,001$; teste de Dunn; $p < 0,05$).....	112
Figura 5-	Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de <i>Danio rerio</i> 168 hpf expostos a concentrações crescentes de NH_3 .	
	(Kruskal-Wallis $H = 139,09$; $p \leq 0,001$; teste de Dunn; $p < 0,05$).....	113
Figura 6-	Fração do tempo total de 10s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas de <i>Danio rerio</i> 168 hpf expostas a diferentes concentrações de NH_3 se mantiveram em repouso (A), em natação rápida (B), ou em natação lenta (C).	
	A: (ANOVA $F = 53,27$ $p < 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$);	
	B: (ANOVA $F = 68,93$ $p < 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$)	
	C: (Kruskal-Wallis $H = 105,78$ $p \leq 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).....	114
Figura 7-	Biomarcadores bioquímicos quantificados em <i>Danio rerio</i> após 96 h de exposição a concentrações crescentes de NH_3 .	
	A: Acetilcolinesterase (AChE); (n = 4; ANOVA $F = 4,9$ $p = 0,001$; Dunnett, $p < 0,05$)	
	B: Glutathiona-s-transferase (GST); (n = 4; ANOVA $F = 4,1$, $p = 0,004$; Dunnett, $p < 0,05$)	
	C: Espécies reativas de oxigênio (ERO); (n = 4; Kruskal-Wallis $H = 6,8$, $p = 0,446$) unidade de fluorescência relativa ao controle (UFR)	
	D: Catalase (CAT) (n = 4; ANOVA $F = 5,7$, $p \leq 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$).	115
Figura 8-	Mapas da trajetória natatória espontânea durante 5 min de monitoramento de larvas de <i>Danio rerio</i> após 7 dias de exposição a diferentes concentrações.....	163

Manuscrito III

Figura 1-	Estações de coleta de água superficial e sedimento na cidade de Caruaru. Mapa A: centro urbanizado da cidade destacado as estações de coleta no sentido leste oeste (curso do rio) AC, MD e DC, B: Mapa da cidade de Caruaru com seu centro urbano inserido dentro da bacia hidrográfica do rio Ipojuca e C: Bacia Hidrográfica do Rio Ipojuca no estado de Pernambuco – Brasil.....	131
Figura 2-	Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de <i>Danio rerio</i> expostas à água superficial e diluições de elutriato das diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru. Painéis	
	A: (Kruskal-Wallis, $H = 20,72$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$)	
	B (Kruskal-Wallis, $H = 13,822$ $p = 0,032$, Dunn $p < 0,05$);	
	(Kruskal-Wallis, $H = 44,515$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);	
	(Kruskal-Wallis, $H = 75,452$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$).....	140

Figura 3- Principais patologias encontradas até 96 hpf em embriões e larvas de *Danio rerio*.

A-Embrião com 24hpf em seu pleno desenvolvimento; B- Ovo fecundado e com desenvolvimento interrompido próximo a 24 hpf; C- Embrião com 48 hpf e a seta evidenciando uma hemorragia no vitelo (He); D- Embrião com 48 hpf em pleno desenvolvimento e com pigmentação normal; E- Embrião com total ausência de pigmento na cabeça, corpo e olho com 48 hpf; F- Larva 72 hpf com estrutura mandibular da boca protrusível anormal (BP); G- Larva com 72 hpf com a estrutura mandibular normal para o tempo de desenvolvimento; H- Boca normal para 96 hpf; I- Edema Pericádico (EPC); J- Larva 96 hpf com desenvolvimento normal, exibindo uma coluna ereta e bexiga natatória bem evidente (BN); K- Larva com 96 hpf evidenciando um edema Perivitelínico (EPV), bexiga natatória ausente (BN) e coluna curvada com escoliose evidenciada pela reta angular vermelha.....142

Figura 4- Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n= 10) expostas à água superficial das diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru.

A: contrações ventriculares em 48 hpf

AC: (ANOVA, $F = 2,44$ $p = 0,033$, Dunnett $p < 0,05$),

MC: (ANOVA, $F = 3,595$ $p = 0,004$, Dunnett $p < 0,05$)

DC: (ANOVA, $F = 89,613$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

B: contrações ventriculares em 72 hpf

AC: (ANOVA, $F = 20,692$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$),

MC: (ANOVA, $F = 1,837$ $p = 0,104$)

DC: (ANOVA, $F = 31,475$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).....146

Figura 5 - Quadro de gráficos da velocidade natatória espontânea média expressa em (cm s^{-1}).

Análise realizada com as diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru. A: AC (ANOVA, $F = 0,217$ $p = 0,97$);

MC: (Kruskal-Wallis, $H = 2,289$ $p = 0,891$)

DC: (ANOVA, $F = 1,443$ $p = 0,216$).....147

Figura 6- Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias após a fertilização (dpf) expostas a água superficial e diluições do elutriato de estações de coleta do Rio Ipojuca na cidade de Caruaru e a água controle (C).

AC Kruskal-Wallis, $H = 5,154$ $p = 0,524$);

MC (ANOVA, $F = 4,785$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$)

DC (ANOVA, $F = 12,485$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).....148

Figura 7- Atividade bioquímica quantificada nos pool de larvas com 24 hpf A- Gráfico da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) expresso em ($\text{nmol TNB min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) B- Gráfico da atividade enzimática da glutathiona-s-transferase (GST) expresso em ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) C- Gráfico da concentração de GSH ($\mu\text{g de GSH mg proteínta}^{-1} \text{ \%controle}$) D- Gráfico da quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) expresso em unidade de fluorescência relativa UFR ($\% \text{ of control mg protein}^{-1}$) E- SOD expressa em ($\text{U SOD mg proteína}^{-1}$) F- Catalase expressa pelo consumo do peróxido ($\text{nmol min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) G- POL expresso em ($\mu\text{M de MDA mg proteínta}^{-1} \text{ \%controle}$)149

LISTA DE TABELAS

Manuscrito I

Tabela 1- Caracterização climática e pluviométrica (mm) das estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca.....	65
Tabela 2- Taxa de mortalidade (%) dos embriões e larvas de <i>Danio rerio</i> expostos às águas superficiais das estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca por 96 h.....	71
Tabela 3A- Frequência (%) de patologias em larvas de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição às águas superficiais do rio Ipojuca.....	76
Tabela 3B- Frequência (%) de patologias em larvas de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição às águas superficiais do rio Ipojuca.....	77
Tabela 4- Dados do índice de estado trófico (IET) e índice de qualidade de água (IQA) dos dois anos de coleta.....	162

Manuscrito II

Tabela 1- Concentrações planejadas (nominais) e quantificadas (reais) de NH ₃ durante a exposição de 96 h de embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	103
Tabela 2. Frequência (%) de patologias em larvas de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição a diferentes concentrações de NH ₃	110

Manuscrito III

Tabela 1- Quantificação de amônia nas amostras de água e na diluição 25% das amostras de elutriato.....	130
Tabela 2- Quantificação de HPA nas amostras de água superficial no trecho do rio Ipojuca que passa pela cidade de Caruaru.....	133
Tabela 3- Frequência de mortalidade por tratamento ao final de 96h de exposição às diluições do elutriato e água superficial do trecho do rio Ipojuca que passa pela cidade de Caruaru.....	138
Tabela 4A- Frequência (%) de patologias em larvas de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição às águas superficiais e elutriato do sedimento do rio Ipojuca no trecho que passa pela cidade de Caruaru.....	143

Tabela 4B- Frequência (%) de patologias em larvas de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição às águas superficiais e elutriato do sedimento do rio Ipojuca no trecho que passa pela cidade de Caruaru.....	144
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

AC.	Antes do Centro Urbano da Cidade de Caruaru
ACh.	Acetilcolina
AChE.	Acetilcolinesterase
ANA.	Agência Nacional de Águas
BChE.	Butirilcolinesterase
CAT.	Catalase
CDNB.	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CENO.	Concentração de Efeito Não Observada
CG.	Cromatografia Gasosa
CL50%96h.	Concentração Letal para 50% dos organismos expostos por um período de 96 horas
Compesa.	Companhia Pernambucana de Saneamento
CPRH.	Agência Pernambucana de Meio Ambiente
DBO.	Demanda Biológica de Oxigênio
DC.	Depois do Centro Urbano da Cidade de Caruaru
DCF-DA.	Diacetato 2,7-Diclorofluorescina
Dpf.	Dias pós-fertilização
DTNB.	Ditiobisnitrobenzato
ERO.	Espécies Reativas de Oxigênio
GMS.	General Morphology Score
GPx.	Glutathione Peroxidase
GR.	Glutathione Redutase
GSH.	Glutathione
GSSG.	Glutathione Reduzida
GST.	Glutathione-s-Transferase
HEA.	High Environmental Ammonia

HPA.	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
hpf.	Horas pós-fertilização
IBGE.	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDE.	Índice de Desenvolvimento Sustentável
IET.	Índice de Estado Trófico
IP.	Estação de Coleta no Rio Ipojuca
IQA.	Índice de Qualidade de Águas
KPI.	Tampão Fosfato de potássio
MC.	Meio do Centro Urbano da Cidade de Caruaru
MDA.	Malondialdeído
OD.	Oxigênio Dissolvido
OECD.	Organization for Economic Cooperation and Development
OUC.	Ornithine Urea Cycle
PBS.	Tampão Fosfato de Sódio
POL.	Peroxidação Lipídica
SECTA.	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco
SOD.	Superóxido Dismutase
TBARS.	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TNB.	Tiolato
USEPA/EPA.	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

I FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
1.1 ECOTOXICOLOGIA E O AMBIENTE AQUÁTICO.....	25
1.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES.....	26
1.2.1 <i>Danio rerio</i> como modelo biológico	27
1.2.2 Parâmetros morfológicos e morfométricos (Aspectos do desenvolvimento embriolarval do <i>D.rerio</i>)	27
1.3 BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IPOJUCA	34
1.3.1 Problemática do Rio Ipojuca	37
1.3.2 Caracterização dos pontos de coleta	37
1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA).....	39
1.5 A DINÂMICA DAS ESPÉCIES DE AMÔNIA NOS CORPOS HÍDRICOS.....	41
1.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ESTRESSE OXIDATIVO	43
1.6.1 Biotransformação	43
1.6.2 Espécies Reativas de Oxigênio	44
1.6.3 Biomarcadores de defesa antioxidante	45
1.6.4 Biomarcadores de danos oxidativos	46
1.6.5 Biomarcador de neurotoxicidade	47
1.7 OBJETIVOS	49
1.7.1 Manuscrito I	49
1.7.2 Manuscrito II	49
1.7.3 Manuscrito III	50
REFERÊNCIAS	51
II MANUSCRITO I	59
Resumo	59
1 INTRODUÇÃO	60
2 METODOLOGIA	62
2.1 ÁREA DE ESTUDO E ESTAÇÕES DE COLETA DE ÁGUA SUPERFICIAL	62
2.2 CULTIVO DOS ORGANISMOS E EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL.....	66
2.3 TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL	66
2.4 GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS).....	66
2.5 FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO	67

2.6	FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES.....	67
2.7	VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA.....	67
2.8	PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S	68
2.9	MEDIDA MORFOMÉTRICA.....	68
2.10	BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)	68
2.11	BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	69
2.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	69
3	RESULTADOS	70
3.1	TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL	70
3.3	GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS).....	72
3.4	FREQUÊNCIAS DE ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS E DO DESENVOLVIMENTO	75
3.5	FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES.....	78
3.7	VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA.....	79
3.8	PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S	81
3.6	COMPRIMENTO TOTAL	84
3.9	BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)	86
3.10	BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	86
4	DISCUSSÃO	87
	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	III MANUSCRITO II	99
	Resumo	99
1	INTRODUÇÃO	100
2	METODOLOGIA	101
2.1	CULTIVO DE <i>Danio rerio</i>	101
2.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EXPOSIÇÃO DURANTE A FASE EMBRIOLARVAL	102
2.3	GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS).....	103
2.4	FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO	104
2.5	FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES.....	104
2.6	MEDIDA MORFOMÉTRICA.....	104

2.7 VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA E TRAJETÓRIAS.....	104
2.8 PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S	105
2.9 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS	105
2.9.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	105
2.9.2 Glutathione-S-Transferase (GST).....	105
2.9.3 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	105
2.9.4 Catalase	106
2.9.4 Quantificação de Proteínas	106
2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	106
3. RESULTADOS	107
3.1 TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL	107
3.2 GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS).....	107
3.3 FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO	108
3.4 FREQUÊNCIAS CARDÍACAS	111
3.5 MEDIDA MORFOMÉTRICA.....	112
3.6 VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA E TRAJETÓRIAS.....	113
3.7 BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	115
3.8 BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE (GST)	116
3.9 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO CATALASE (CAT) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	116
3.9.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	116
3.9.2 Catalase	116
4 DISCUSSÃO	116
CONCLUSÃO.....	120
REFERÊNCIAS	120
III Manuscrito III.....	126
Resumo	126
1 INTRODUÇÃO	127
2 METODOLOGIA.....	128
2.1 CULTIVO DOS ORGANISMOS E EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL E DILUIÇÕES DO ELUTRIATO.....	128
2.2 COLETA DE ÁGUAS SUPERFICIAIS E PRODUÇÃO DO ELUTRIATO	129

2.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIA E HPA DAS AMOSTRAS.	132
2.2.1 Quantificação das concentrações de amônia nas amostras de água e diluições de elutriato	132
2.2.2 Quantificação das concentrações de HPA nas amostras de águas superficiais	132
2.4 TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL	133
2.5 ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO	133
2.6 FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO	134
2.7 FREQUÊNCIA CARDÍACA	134
2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE)	135
2.5.2 Glutathione - S - Transferase (GST).....	135
2.5.3 Glutathione (GSH).....	135
2.5.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	136
2.5.5 Superóxido Dismutase (SOD).....	136
2.5.6 Catalase (CAT)	136
2.5.7 Peroxidação lipídica (POL)	136
2.5.8 Quantificação de Proteína	137
2.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	137
3 RESULTADOS	137
3.1 CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E HPA	137
3.2 TAXAS DE MORTALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL	138
3.3 ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO	138
3.4 FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO	141
3.5 FREQUÊNCIA CARDÍACA	145
3.6 VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA.....	147
3.7 MEDIDA MORFOMÉTRICA	147
3.8 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS	148
3.8.1 Acetilcolinesterase (AChE)	148
3.8.2 Glutathione-S-Transferase (GST).....	148
3.8.3 Glutathione (GSH).....	151
3.8.4 Espécies reativas de Oxigênio (ERO)	151
3.8.5 Superóxido Dismutase (SOD).....	151
3.8.6 Catalase (CAT)	151

3.8.7 Peroxidação Lipídica (POL)	151
4 DISCUSSÃO	151
CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIA	155
ANEXO 1	162
ANEXO 2	163

I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 ECOTOXICOLOGIA E O AMBIENTE AQUÁTICO.

A ecotoxicologia surgiu como resposta aos problemas causados pelos avanços tecnológicos humanos que tanto contribuem para a degradação do meio ambiente (Jørgensen, 1998). A toxicologia aquática é o estudo do efeito de produtos químicos manufaturados, atividades antropogênicas e naturais (coletivamente denominados agentes ou substâncias tóxicas) em organismos aquáticos em vários níveis de organização, desde o subcelular, passando pelo indivíduo, até as comunidades e ecossistemas (Rand; *et al.*, 1995). Desta forma ecotoxicologia pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos deletérios não intencionais causados por compostos químicos nos ecossistemas e organismos que os constituem (Walker, 2005).

A complexidade dos ambientes aquáticos proporciona uma grande diversidade de ecossistemas dentre os quais se encontram rios, lagos, estuários, recifes e oceanos e cada um desses com suas características físicas, químicas, biológicas e ecológicas específicas e até distintas umas das outras. No entanto, o compartimento água termina sendo-o destino de diversos contaminantes frutos da atividade antropogênica. A forma como o ambiente reage sendo receptor de determinada carga de contaminante ou poluente vai depender das características físicas e químicas dos contaminantes; dos produtos de transformação e biotransformação; o tempo que ficou em contato com o corpo receptor, além da concentração destes no ambiente (Costa *et al.*, 2008).

O desenvolvimento antropogênico carregou consigo a criação de uma gama enorme de xenobióticos que é descartada erroneamente todos os dias nos corpos hídricos. A mistura destes contaminantes podem gerar novos compostos como o DDT-DDE e o mercúrio, podem potencializar o efeito biológico de outra molécula como alguns HPAs e em alguns casos podem debilitar os organismos deixando os vulneráveis a outras moléculas como a amônia. Parte destas moléculas já presentes na coluna d'água, como alguns poluentes orgânicos persistentes (POP), chegam ao sedimento a partir do processo de conjugação com matéria orgânica particulada suspensa na mesma (Wölz *et al.*, 2010). O processo se dá devido à baixa solubilidade em água, fazendo com que alguns contaminantes como os POPs não dissolvam facilmente. Então boa parte destes xenobióticos termina sedimentando ou aderindo a tecidos biológicos podendo causar algum efeito deletério (Incardona e Scholz., 2016).

Em uma situação em que o rio perene muitas destas contaminantes tem uma distribuição maior devido à fluidez constante do rio. No entanto, em um rio intermitente ou com trechos intermitentes existe a possibilidade destas moléculas concentrarem em um único ponto, podendo sedimentar no leito do rio, próximo ao local de descarte, ou aumentar a toxicidade da água para os organismos em um único ponto (Chiu *et al.*, 2017). Estas moléculas podem ficar presas no sedimento, serem ressuspensas por processos de dragagem (Roberts, 2012) ou até eventos climáticos mais dinâmicos, voltando a ficar biodisponíveis. A sedimentação e ressuspensão destas moléculas no sedimento podem causar danos para estágios iniciais de vida de organismos em contato (Hallare *et al.*, 2005), organismos que vivem nos interstícios do solo (Liu *et al.*, 2020) e na coluna d'água (Akito *et al.*, 2014).

1.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES

Na ecotoxicologia os peixes são de grande importância por apresentarem uma ampla capacidade adaptativa no ambiente aquático, para onde boa parte dos contaminantes é carregada (Di Giulio e Hinton, 2008), na maioria dos casos oriundos de esgoto, lixiviado agrícola e rejeitos industriais. Os peixes são um importante grupo de identificação de toxicidade no compartimento aquático devido sua ampla distribuição em diferentes ecossistemas com diferentes variações de temperatura, pressão, pH e outros fatores abióticos. Estas características fizeram deles um grupo amplamente utilizado no desenvolvimento de pesquisas que beneficiam a saúde humana e a ecologia (Di Giulio e Hinton, 2008). Os peixes representam um amplo grupo para pesquisas de qualidade de águas marinhas, água doce e salobra, tendo relevância em testes agudos, de curta duração, e crônicos de maior duração em laboratório e no campo.

A quantificação dos efeitos biológicos através de biomarcadores levanta dados para o entendimento dos efeitos dos contaminantes nos organismos expostos a diferentes xenobióticos no ambiente. O termo biomarcador é geralmente usado em um sentido amplo que para incluir a maioria das medidas que reflitam uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, onde os efeitos biológicos variam de respostas moleculares a celulares e de respostas fisiológicas a mudanças comportamentais (R. Van Der Oost, 2016). Desta forma, bons biomarcadores são índices sensíveis à biodisponibilidade e respostas biológicas iniciais, elucidando as relações de causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde, em diagnósticos clínicos e para fins de monitoramento (Altenbuger *et al.*, 2003). Logo, a utilização de um bom bioindicador é precedida pelo amplo conhecimento de seus aspectos

fisiológicos, morfológicos e comportamentais a fim de facilitar e garantir a interpretação correta dos resultados obtidos durante o processo experimental (Castro, 2013).

1.2.1 *Danio rerio* como modelo biológico

O peixe paulistinha ou “zebrafish” *Danio rerio* é um teleósteo de água doce, pertencente à família Cyprinidae, originário do sul asiático, e de fácil criação em cativeiro. No Brasil é muito utilizado em aquarismo, sendo possível encontrar inúmeras variedades naturais e transgênicas. Indivíduos adultos desta espécie possuem comprimento em torno de quatro centímetros exibindo dimorfismo sexual bem aparente onde os machos se apresentam de forma mais alongada, delgados, e em sua maturidade sexual são mais alaranjados (Siebel, 2015). As fêmeas apresentam uma região ventral maior, quando comparada à região ventral dos machos, com a coloração prateada. Um indivíduo adulto pode viver de dois a quatro anos com alta produção de ovos. Uma fêmea adulta em uma única desova pode colocar 200 ovos (Siebel, 2015). A fecundação do paulistinha é externa e o desenvolvimento embrionário é facilmente observado, pois o córion do ovo e o embrião são translúcidos.

O *Danio rerio* já se mostrou um excelente bioindicador de efeitos ecotoxicológicos devido seus diferentes aspectos, morfológicos, fisiológicos e comportamentais que permitem a avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes. Podem-se classificarem três as grandes vantagens do uso do zebrafish na pesquisa, o baixo custo, o rápido desenvolvimento e o repertório de ferramentas desenvolvidas que descrevem atributos importantes da biologia desta espécie (Siebel, 2015). Diante das vantagens apresentadas pelo *D.rerio*, este organismo vem sendo amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos como modelo biológico. Dito isto, foi avaliado que o *Zebrafish Embryotoxicity Test* (ZFET) é um método robusto com uma boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial para a maioria dos produtos químicos e laboratórios (Busquet *et al.*, 2014). Além disso, *D.rerio* também se tornou um modelo amplamente utilizado em variados experimentos toxicológicos no âmbito da biomedicina e farmacologia por apresentar 71% de genes ortólogos com a espécie humana (Howe *et al.*, 2013).

1.2.2 Parâmetros morfológicos e morfométricos (Aspectos do desenvolvimento embrionário do *D.rerio*)

1.2.2.1 General Morphology Score (GMS)

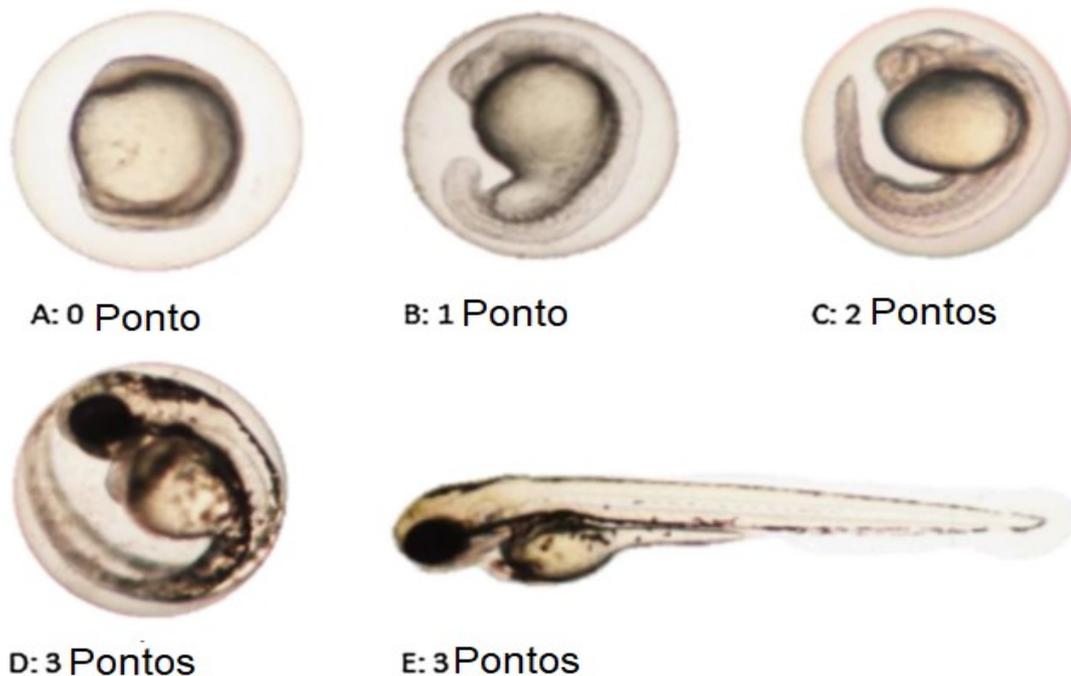
O índice de desenvolvimento morfológico (GMS) se baseia na atribuição de pontos ao embrião/larva sendo observada durante seu desenvolvimento conforme marcos morfológicos

importantes são formados entre 0-96 horas pós-fertilização (hpf). Cada embrião e larva de cada tratamento são avaliados cuidadosamente ao longo de quatro dias ou 96h para avaliar a presença dos eventos ou marcos morfológicos esperados descritos em detalhe abaixo. Ao final das 96h de exposição o indivíduo saudável deve ter numeração igual a 17 pontos (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

1.2.2.2 Destacamento da cauda

Após completar um dia de fertilizado (24 hpf a 30 hpf), embriões apresentando cauda destacada até a extensão do saco vitelínico recebem um ponto (Figura 1B). Mais um ponto é dado quando a cauda se destaca além da extensão do saco vitelínico (Figura 1C). O desprendimento total da cauda a partir de 48 hpf também gera adição de mais 1 ponto (Figura 1D) (Beekhuijzen *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 1 Destacamento da calda do *Danio rerio* durante entre 12 hpf e 72 hpf evidenciando A- organismo em torno de 10 hpf; B- Organismos com cerca de 16 hpf; C- Organismos com cerca de 24 hpf; D- organismo com cerca de 48 hpf e E- Organismo com cerca de 72 hpf.

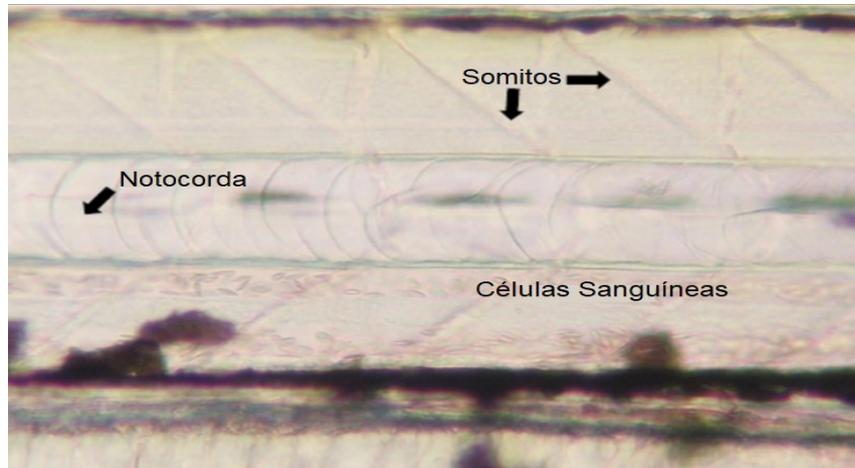


Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015) – Adaptada

1.2.2.3 Formação dos somitos

No segundo dia após a fertilização (24 hpf a 30 hpf), um ponto é atribuído a formação e presença visível de somitos no embrião após 24 hpf (Beekhuijzen *et al.*, 2015) (Figura 2).

Figura 2. Região dorsal do *Danio rerio* com setas evidenciando os somitos já se diferenciando em Miótomos (Originando a musculatura dorsal) e Esclerótomo (Originará as vertebrae em volta da notocorda); A notocorda em si destacada pela seta preta e as células sanguíneas em evidência.



Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015) – Adaptada.

1.2.2.4 Formação dos olhos

Quando não há olhos visíveis, nenhum ponto é atribuído ao embrião. Quando os olhos são visíveis, mas planos, um ponto é atribuído (Figura 3A). Após o aparecimento de uma esfera, o desenvolvimento do olho é marcado com dois pontos (Figura 3B). A partir das 48 hpf, se os olhos apresentarem pigmentação (Figura 3C, D), será acrescentado mais um ponto para esse marco morfológico (Beekhuijzen *et al.*, 2015) (Figura –5).

Figura 3. Desenvolvimento do olho do *Danio rerio* até as 96 hpf. Imagem A- Estrutura ocular em formação por volta de 13 hpf; B- Globo ocular formado por volta de 24 hpf; C- Globo ocular formado e pigmentado por volta de 48 hpf e D- Globo ocular formado e bem pigmentado ao final das 96 hpf.



Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015) – Adaptada.

1.2.2.5 Movimento

Será atribuído um ponto em 24 hpf, quando o embrião/larva mover a cauda ou o corpo inteiro. Quando as nadadeiras peitorais se desenvolverem, o movimento das mesmas também é considerado como movimento. O movimento pode ser espontâneo, ou após estimulação com

pipeta pasteur de plástico, mas sem tocar no embrião. O estímulo deve ser feito com a inserção de ar no volume da solução do poço, criando um fluxo e bolhas no poço. Movimento pode ser marcado como ausente com 0 pontos, ou presente com um ponto (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

1.2.2.6 Circulação

Será atribuído um ponto entre 24 hpf, quando for verificada a presença de circulação sanguínea. Circulação sanguínea existente de algumas células já é marcada com um ponto nas primeiras 24 horas de exposição. No entanto, este ponto de desenvolvimento ficará mais evidente após a observação do batimento cardíaco após 48 hpf (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

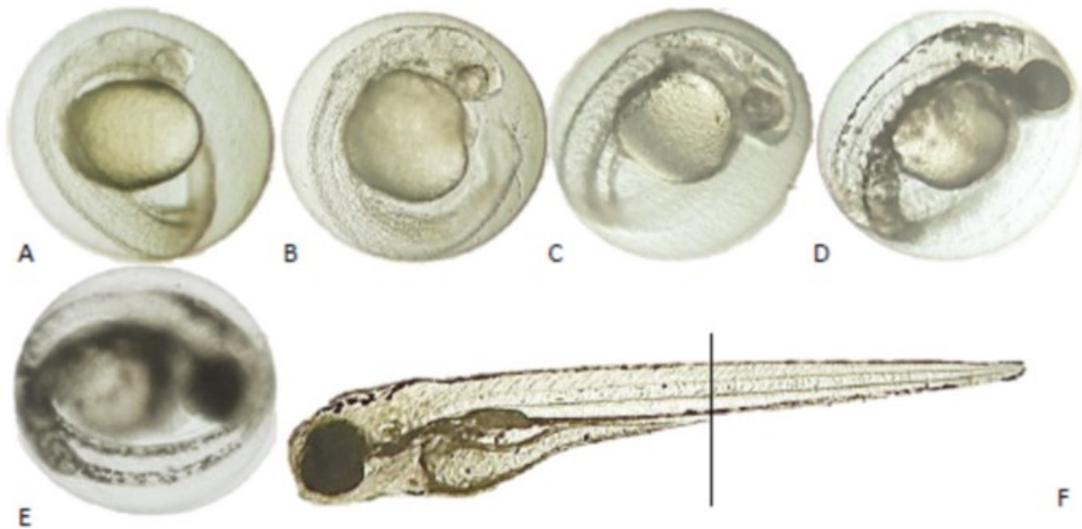
1.2.2.7 Batimento cardíaco

Será atribuído um ponto no terceiro dia após 48 hpf quando for verificada a presença de batimento cardíaco. Quando não for possível visualizar o batimento cardíaco, uma maior ampliação (de cerca de 80X) deve ser usada para melhor visualizar a região do coração para procurar a presença de um batimento cardíaco muito fraco. Isto é feito durante pelo menos um minuto até que um ou mais batimentos cardíacos distintos sejam anotados. Caso não seja detectado mesmo assim, é considerado ausente, e indica morte do embrião ou larva (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

1.2.2.8 Pigmentação da cabeça, corpo e cauda.

Será atribuído um ponto no terceiro dia após 48 hpf, quando for verificada a presença de pigmentação da cabeça e do corpo (Figura 4), e mais um ponto para a presença de pigmentação da cauda. A pigmentação da cabeça e do corpo é avaliada como presente quando o pigmento é visível entre a cabeça e a extremidade do saco vitelínico. Já a pigmentação da cauda é avaliada como presente quando um padrão distinto de pigmento é visível a partir da extremidade da extensão do saco vitelínico para a cauda. A pigmentação da cabeça e do corpo é muitas vezes visível mais cedo do que a pigmentação da cauda (Beekhuijzen *et al.*, 2015)

Figura 4. *Danio rerio* entre 24 e 96 hpf com as imagens de A-F evidenciando o progresso na quantidade de massas pigmentares escuras em todo o comprimento larval e nos olhos.



Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015) – Adaptada.

1.2.2.9 Nadadeira peitoral

Será atribuído um ponto no quarto dia após 96 hpf, quando for verificada a presença das nadadeiras peitorais (Figura 5), mesmo que apenas uma nadadeira esteja visível. As nadadeiras peitorais originam-se aproximadamente entre o coração e o fígado, estendendo-se posteriormente ao longo de cada lado da larva (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

Figura 5. Progresso do desenvolvimento da nadadeira peitoral entre os momentos 48, 72 e 96 hpf no embrião larva de *Danio rerio*.

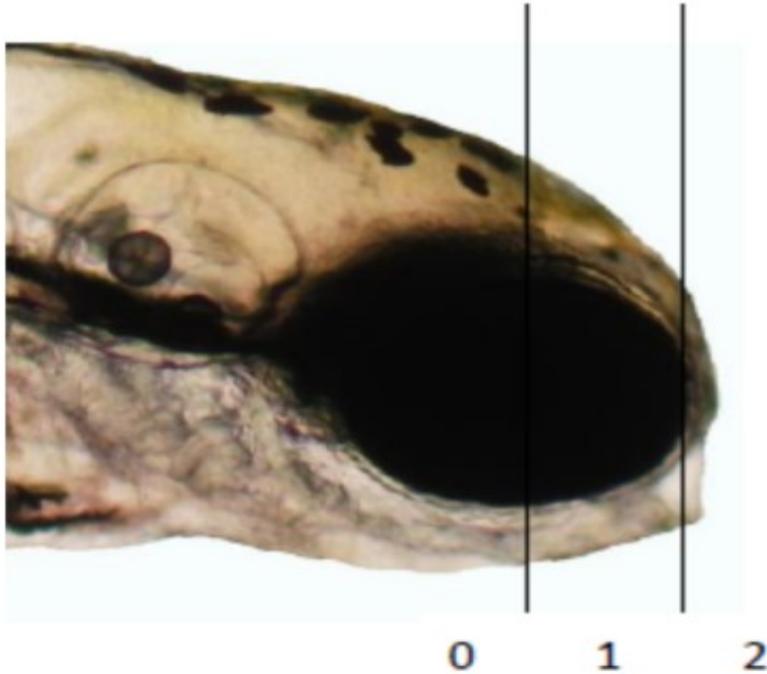


Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015)– Adaptado.

1.2.2.10 Boca protrusível

Será atribuído 1 ponto entre 72 hpf e 96 hpf, quando for verificada a presença de boca protrusível, quando a mandíbula inferior do embrião/larva atinge toda a extensão do olho, e mais 1 ponto é atribuído quando a mandíbula inferior atinge a frente do olho ou mais (Figura 6). A boca protrusível é considerada ausente quando não é observada mandíbula inferior ou quando a mandíbula inferior atinge apenas cerca de metade do olho (ao nível da pupila) (Figura 6) (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

Figura 6. Atribuição do desenvolvimento da boca no *Danio rerio*. A boca na posição zero faz o organismos receber a pontuação 0, enquanto que o organismo com 72 hpf e com o desenvolvimento normal recebe pontuação 1 pois a boca está na altura da parte posterior do olho e em 96 hpf o aparato mandibular eleva a boca a pontuação 2.



Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015)– Adaptada.

1.2.2.11 Eclosão

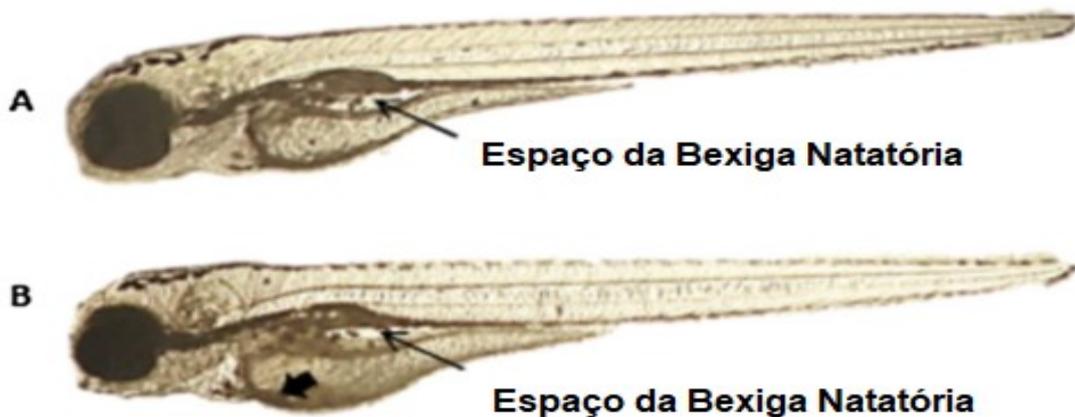
Será atribuído um ponto entre 72 hpf, quando for verificada a eclosão da larva. A eclosão é considerada aplicável quando o corpo do embrião não está mais cercado pelo córion, sendo considerada larva a partir deste momento. Quando há eclosão antes ou depois das 72 horas pós-exposição não haverá pontuação, mas essa observação deverá ser anotada, pois o tempo de exposição da larva (sem o córion) ao contaminante poderá ser influenciado (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

1.2.2.12 Extensão do saco vitelínico

Esse marco morfológico é pontuado com um quando a extensão do saco vitelínico estiver quase vazia e com zero para não vazio (Figura. 7), sendo observadas as 96 hpf. A avaliação deste marco morfológico é feita observando se a espessura do saco vitelínico não excede o coração, permitindo a visualização de um espaço onde a bexiga natatória ficará situada. Um embrião que apresente problema na absorção do vitelo, provavelmente não irá pontuar neste item, visto que o saco vitelínico estará cheio e sua espessura excederá o

coração, comprimindo assim a extensão do saco vitelínico de forma que não haverá espaço para desenvolvimento da bexiga natatória (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

Figura 7. Extensão do saco vitelínico e espaço para insuflamento da bexiga em organismos saudáveis no período entre as 72 e 96 hpf. A- 96hpf o vitelo está na altura no coração e B- 72 hpf vitelo excede a linha do coração evidenciado pela seta preta.

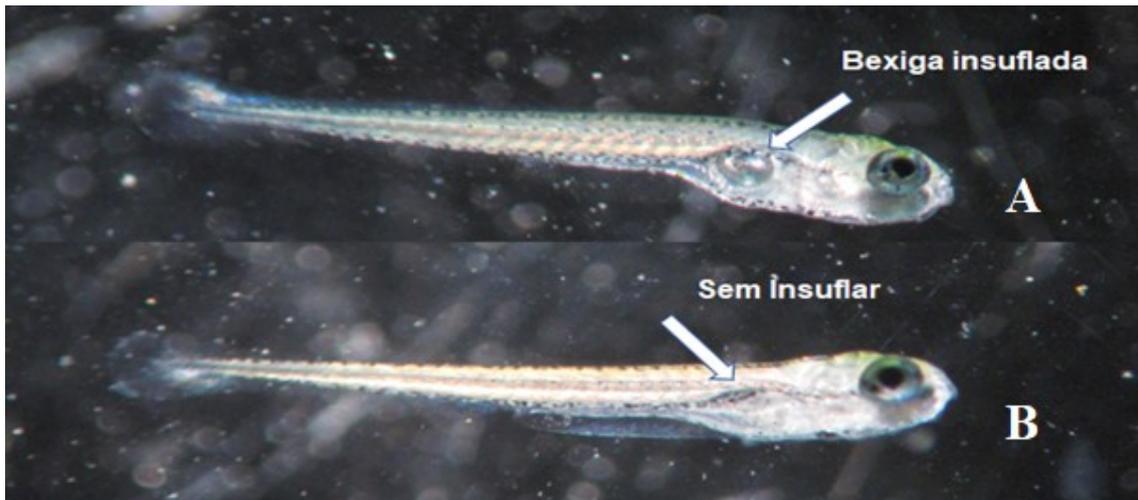


Fonte: (Beekhuijzen *et al.*, 2015) – Adaptado.

1.2.2.13 Insuflamento da bexiga natatória

A bexiga natatória (Figura. 8) tipicamente infla no período entre 72hpf e 96hpf (Hagenaars *et al.*, 2014), sendo essencial a absorção do saco vitelínico para que haja a abertura do espaço onde se posiciona a bexiga. Na proposta do GMS de (Beekhuijzen *et al.*, 2015), não há previsão de avaliação deste marco morfológico. Neste trabalho estamos acrescentando a avaliação deste marco morfológico, e a atribuição de um ponto quando a bexiga está insuflada ao final de 96hpf, totalizando um máximo de 18 pontos para uma larva perfeita ao final de 96hpf.

Figura 8. *Danio rerio* saudável com 96 hpf, as setas em branco evidenciam a bexiga natatória. A- Organismos com bexiga natatória insuflada e bem aparente B- Organismo com bexiga não insuflada.



Fonte: Célio Mariz

1.3. BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IPOJUCA

A Bacia hidrográfica do rio Ipojuca compreende uma área de drenagem de 3.435,34 Km² ao longo de um percurso de 320 km no sentido Oeste-Leste. O Rio Ipojuca desemboca no mar ao lado do complexo portuário de Suape, que teve sua morfologia bastante modificada devido à instalação do Porto de Suape. Seus limites são identificados ao norte pelas bacias dos rios Capibaribe no estado de Pernambuco e Paraíba no estado da Paraíba; a oeste pelas bacias afluentes do rio São Francisco; ao sul pelas bacias dos rios Una e Sirinhaém; e a leste pelas bacias Litorâneas de Pernambuco e pelo Oceano Atlântico.

Durante seu percurso, da nascente até as proximidades da cidade de Caruaru, o rio possui um regime fluvial intermitente e segue perene até Suape sendo alimentado por rios adjacentes. O rio Ipojuca possui um regime fluvial intermitente da nascente até as proximidades da cidade de Caruaru, a partir da qual segue seu fluxo de forma perene até Suape, sendo alimentado por rios adjacentes.

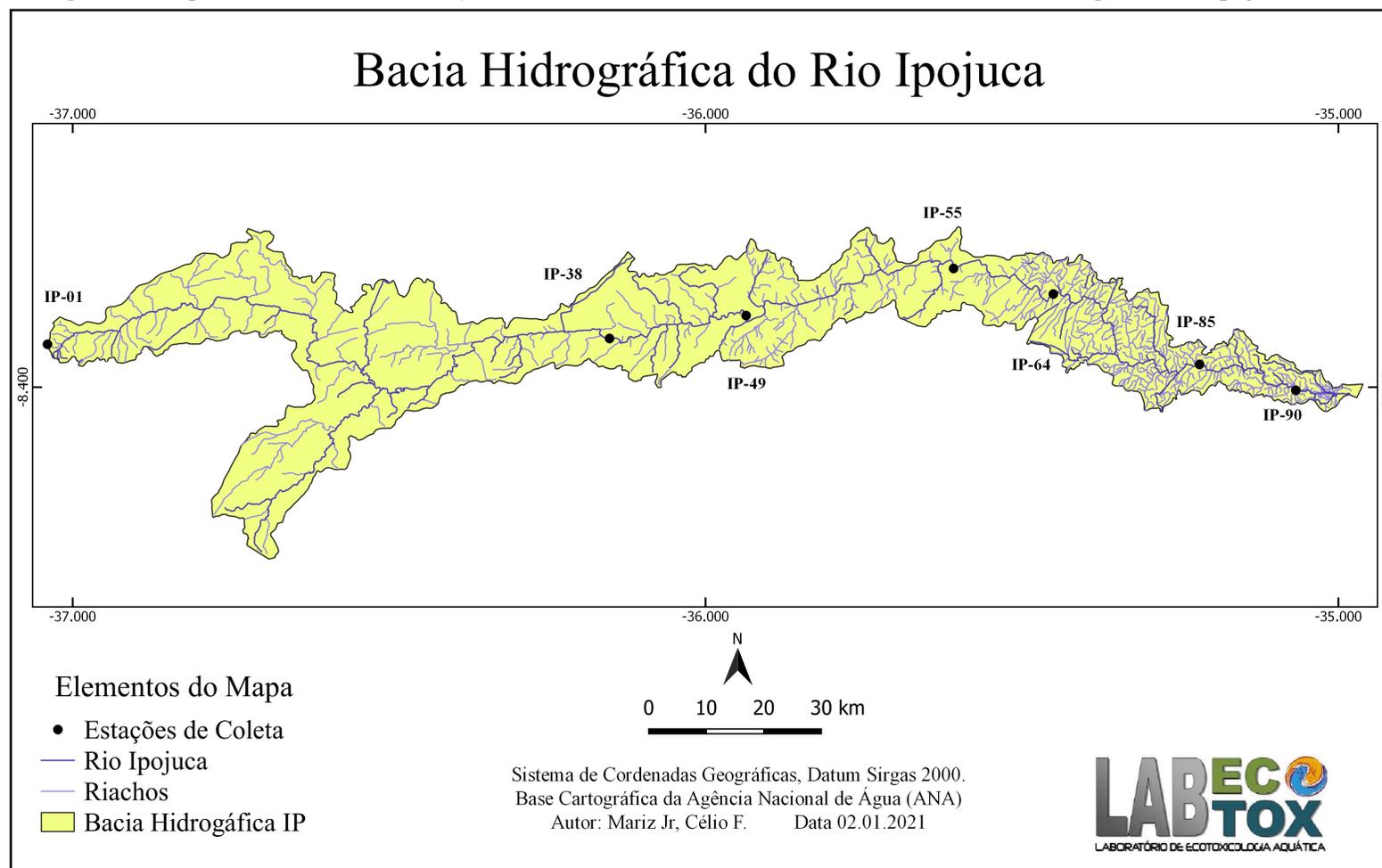
A nascente do rio está localizada no município de Arcoverde na Serra das Porteiras a uma altitude de 876 m. Ao longo de seu percurso recebe vários afluentes: Riacho Liberal; riacho Taquara; riacho Mel; riacho Coutinho; riacho dos Mocós; riacho do Muxoxo e riacho Pata Choca. Dentre os riachos que contribuem com maior quantidade de água está o riacho Liberal que percorre um total de 47 km de extensão indo de Alagoinha a Sanharó.

A agência pernambucana do meio ambiente (CPRH) é responsável pelo monitoramento de todas as bacias hidrográficas do estado de Pernambuco, sendo também responsável pela avaliação da toxicidade nas estações de captação de água ao longo do curso do rio Ipojuca. Na bacia hidrográfica do Ipojuca a CPRH faz coleta em 14 pontos sendo duas

na região do estuário IP-97 e IP-99. Este trabalho utilizou sete estações de coleta da CPRH, os quais estão evidenciados no mapa (Figura. 9).

A resolução Conama 357/2005 (Brasil, 2005) estabelece que as classes 1 e 2 das águas superficiais de ambientes de água doce e salobra não devem apresentar efeito tóxico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Alguns dos parâmetros avaliados pela CPRH nas bacias hidrográficas são: Parâmetros físicos da água (pH, temperatura, oxigenação, alcalinidade, condutividade, turbidez, salinidade), Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e fósforo total, além dos índices de eutroficação total (IET) e de qualidade de águas (IQA). Além disso, são realizadas análises bacteriológicas e testes de toxicidade com organismos vivos microcrustáceos (*Daphnia magna*) e fotobactérias (*Vibrio fischeri*) em efluentes industriais, águas de rios, estuários e reservatórios. A rede de monitoramento de águas superficiais da CPRH não analisa a concentração química de nenhum contaminante orgânico nas amostras de água superficial, e o teste ecotoxicológico aplicado pela CPRH em algumas das estações de água doce do Rio Ipojuca avalia exclusivamente a toxicidade a nível letal para o invertebrado aquático de água doce *Daphnia magn*.

Figura 9. Mapa evidenciando as estações de coleta da CPRH utilizadas neste trabalho ao longo do Rio Ipojuca.



Fonte: Célio Mariz

1.3.1 Problemática do Rio Ipojuca

O rio Ipojuca foi considerado o terceiro rio mais poluído do Brasil em 2013 segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O rio Ipojuca sofre diferentes pressões ao longo de seu curso por diferentes atividades antropogênicas, incluindo a indústria sucroalcooleira, pecuária, agroindústria, química, têxtil, metalúrgica, de vestuários e tecidos, de bebidas, de produtos farmacêuticos e veterinários, que juntamente com as pressões decorrentes das áreas urbanizadas e esgotos domésticos, fazem com que a qualidade das suas águas seja prejudicada (CPRH, 2014).

As diferentes fontes poluidoras contribuem com uma diversidade grande de classes de contaminantes com diferentes potenciais tóxicos, tornando as águas superficiais do Rio Ipojuca misturas complexas destes contaminantes orgânicos e inorgânicos. Os ambientes industriais na cidade de Caruaru são representados em parte pelas indústrias têxteis que na maior parte não trata seus efluentes (Carvalho *et al.*, 2020) e em regiões com a presença de pecuária, policultura e monoculturas de açúcar é comum encontrar a presença de organofosforados (Gupta *et al.*, 2018) utilizados para a correção do solo, como aditivos e na medicina veterinária.

1.3.2 Caracterização dos pontos de coleta

1.3.2.1 IP01

A nascente está localizada no sítio pedreira a 876 m de altitude. Esta estação de coleta é a nascente e está localizada na cidade de Arcoverde em meio ao Sertão pernambucano. A cidade tem uma economia movimentada e baseada em sua maior parte na agropecuária de bovinocultura e caprinocultura. Além disso, a cidade também está envolvida na produção de frutas, cana-de-açúcar e algodão que é de grande importância para a região que está envolvida na distribuição de matéria prima para a confecção de tecidos (Figura 9).

Segundo o IBGE em 2019 a população de Arcoverde era de 74.338 habitantes correspondendo a 196,05 habitantes/ Km² em 2010, ainda segundo o IBGE, havia um total de 86,4% de esgotamento sanitário adequado apesar de só haver uma unidade de tratamento de esgotamento sanitário.

1.3.2.2 IP38

Esta estação de coleta fica localizada a montante da cidade de São Caitano, em meio ao Agreste pernambucano, próximo à fazenda Pato Branco na chamada passagem molhada. A

cidade de São Caetano possui uma população de 35.274 habitantes e uma densidade demográfica de 92 habitantes / Km² segundo o IBGE em seu último censo de 2010. A cidade conta com abastecimento de água fornecido pela Companhia Pernambucana de Saneamento (Compesa) e 50,2 % da população conta com esgotamento sanitário completo, ainda de acordo com o IBGE em seu censo de 2010 (Figura 9).

A Economia da cidade baseia-se no turismo histórico-cultural com pouca incidência de grandes indústrias. O trecho do rio que passa por São Caetano não é perene, e desta forma em determinados períodos do ano o que alimenta o rio é o esgotamento sanitário da cidade.

1.3.2.3 IP49

A cidade de Caruaru no Agreste pernambucano possui uma população de 314.912 habitantes, densidade demográfica de 342,07 habitantes por Km² e é um polo industrial da área têxtil, além do envolvimento direto com o setor terciário no que diz respeito à cultura e festividades. A cidade possui 81,3% de seu esgotamento sanitário adequado.

Esta estação de coleta IP49, a jusante da cidade de Caruaru, é o ponto mais problemático do Rio Ipojuca já tendo sido diagnosticada elevada toxicidade das águas superficiais para o invertebrado de água doce *Daphnia magna* pela Agência pernambucana de Meio Ambiente (CPRH) (Figura 9). O trecho do rio que percorre a cidade de Caruaru não é perene nos períodos mais secos do ano e é alimentado pela água do esgoto oriunda da cidade, sendo a área que apresenta os maiores picos de amônia segundo relatórios semestrais da CPRH (CPRH, 2020b; a).

1.3.2.4 IP55

A estação de coleta IP55 está localizada no município de Gravatá no Agreste pernambucano (Figura 9). Neste ponto o rio já possui regime perene. A cidade de Gravatá conta com uma população de 76.458 habitantes, com uma densidade demográfica de 150,87 habitantes por Km² e esgotamento sanitário adequado para 65% da população, segundo o censo de 2010 do IBGE.

A economia da cidade é baseada na agricultura, pecuária que vem com força devida uma tradição local, além do comércio varejista. A cidade também é culturalmente ativa, sendo procurada como ponto de referência nas festividades juninas.

1.3.2.5 IP64

Esta estação de coleta está localizada na cidade de Chã Grande no Agreste de pernambucano e conta com uma população de 20.107 habitantes e com densidade demográfica de 237,33 habitantes por Km² segundo o censo do IBGE de 2010 (Figura 9). A cidade tem 47,5% do esgoto adequadamente tratado ainda segundo o IBGE em seu ultimo censo de 2010.

A Economia do estado é baseada em atividades agrícolas, devido ao solo agricultável e atividades industriais manufatureiras, sendo esta bem menor quando comparada com a atividade agrícola.

1.3.2.6 IP85

Esta estação de coleta está localizada na cidade de Escada na Zona da Mata-Sul pernambucana. A cidade possui uma população de 63.517 habitantes e uma densidade demográfica de 183,07 habitantes por Km² segundo o censo do IBGE de 2010 (Figura 9). A cidade conta com um sistema completo de esgotamento domestico para 37% da população. A cidade está diretamente ligada à produção de açúcar e álcool, além da produção de inox e monocultura de cana de açúcar.

1.3.2.7 IP90

Esta estação de coleta está localizada na região metropolitana do Recife, na cidade de Ipojuca, próximo a uma usina de produção de cana. A cidade conta com uma população de 8.637 segundo o censo de 2010 pelo IBGE (Figura 9). A cidade possui uma densidade demográfica de 152,98 habitantes por Km² segundo o censo do IBGE de 2010. A cidade conta com esgotamento adequado 50,3% da população.

A principal atividade econômica da cidade de Ipojuca é o turismo devido a sua grande área de praias. Devido ao complexo industrial portuário de Suape que fica na cidade, existem indústrias de grande porte na região do município que estão envolvidas com a produção de diferentes plásticos, metalúrgicas, mateias de construção e outros produtos.

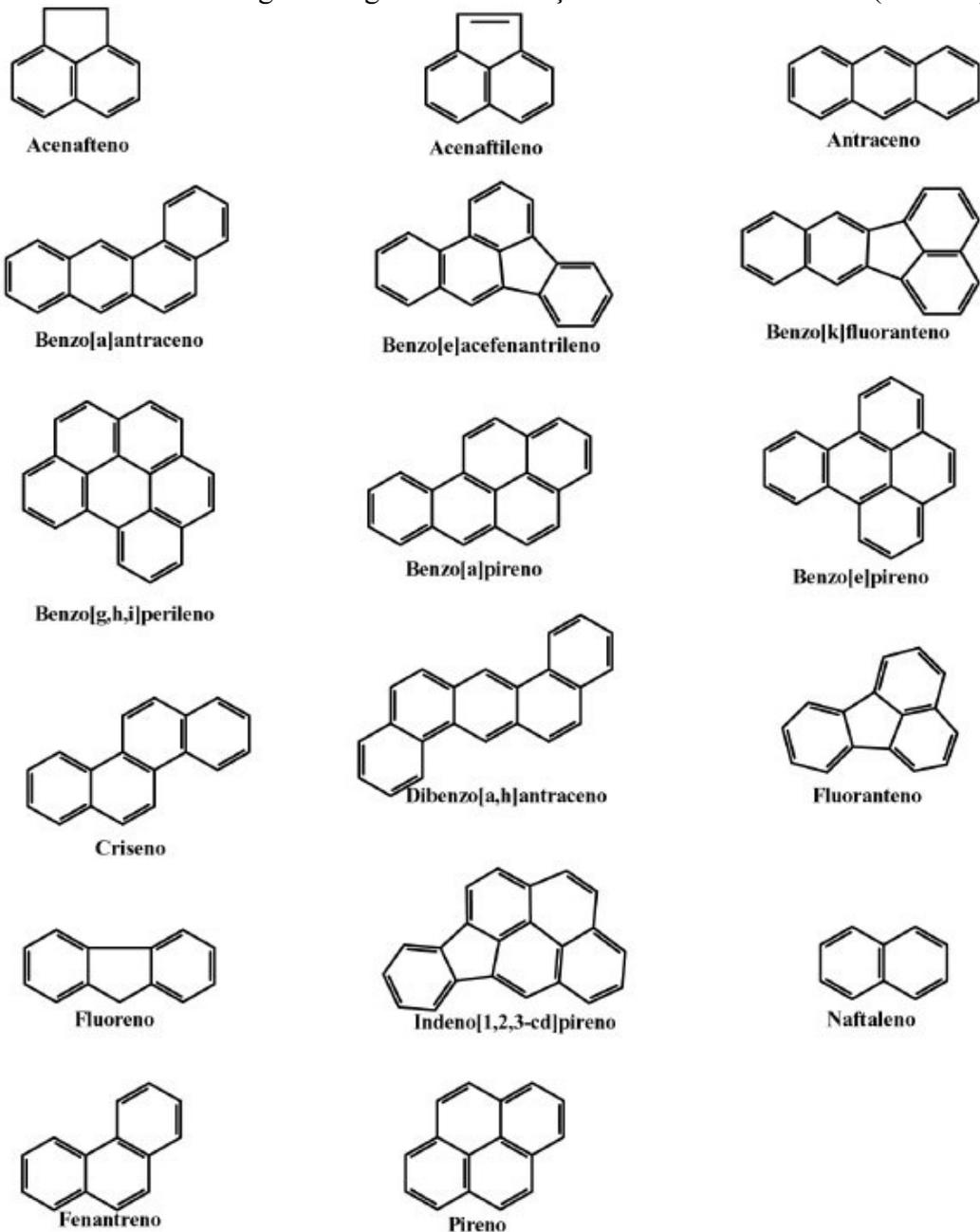
1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são constituintes importantes do petróleo, e também podem ser formados a partir da queima de combustíveis fósseis ou decorrente de processos industriais (Johnson *et al.*, 2008). Estas moléculas são formadas por carbono e hidrogênio, e é considerado HPA todo hidrocarboneto que possua em sua

composição dois ou mais anéis benzênicos condensados. De forma geral HPA possuem baixa solubilidade em água e baixa volatilidade, e a meia vida desses compostos varia de um a dois meses em ambiente aquático, de dois meses a dois anos em óleo, e de oito meses a seis anos em sedimento um pouco mais arenosos (Mackay *et al.*, 1993).

Os HPA constituem um grupo de poluentes químicos lipofílicos e onipresentes em basicamente todos os ambientes aquáticos (Dissanayake e Bamber, 2010). São importantes indicadores de contaminação por petróleo e seus derivados. Possuem um potencial mutagênico e carcinogênico alto, podendo causar problemas morfológicos e comportamentais em diversos organismos aquáticos, em especial nos estágios iniciais de vida (Incardona *et al.*, 2011; Vergauwen *et al.*, 2015). Além disso, os HPA encontrados nos corpos hídricos que estão inseridos no ambiente urbanizado são fruto em grande parte do escoamento de águas pluviais, e possuem toxicidade relevante (Reddy *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2017). Dentre as diferentes espécies químicas encontradas dentro do grupo dos HPA foram estabelecidos 16 hidrocarbonetos poliaromáticos como de maior relevância para o monitoramento ambiental de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América (EUA) (Cristale *et al.*, 2008) (Figura-10).

Figura 10. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados os principais para monitoramento ambiental segundo Agência de Proteção ambiental Americana (USEPA).



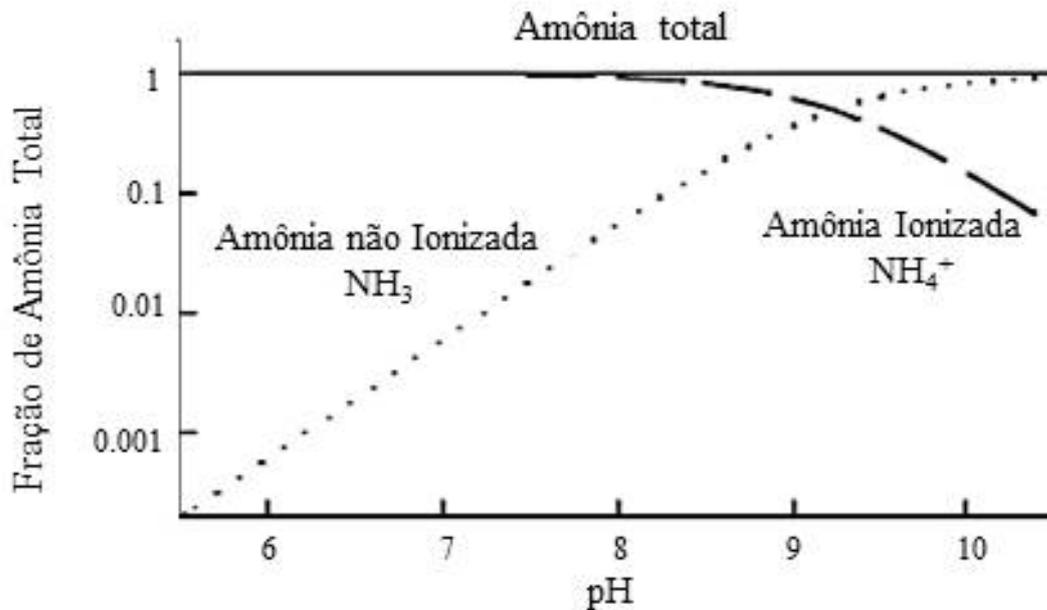
Fonte: United States Environmental Protection Agency (US EPA)

1.5 A DINÂMICA DAS ESPÉCIES DE AMÔNIA NOS CORPOS HÍDRICOS

A amônia em condições normais de temperatura e pressão se apresenta como um gás incolor com cheiro forte e possui potencial tóxico. Este composto é produzido em sua maior parte pelo processo de decomposição de matéria orgânica, sendo mais específico, de fontes orgânicas ricas em proteína. Níveis elevados anormais de amônia no meio ambiente em sua maioria se dão pela descarga de esgoto doméstico, lixiviação de áreas agrícolas e rejeitos

industriais (Fairchild *et al.*, 2005). O processo de especiação do amônio (NH_4^+) em amônia não ionizada (NH_3) está diretamente ligada aos fatores ambientais temperatura e principalmente o pH (Randall e Tsui, 2002)(Figura-11).

Figura 11- Gráfico evidenciando o processo de especiação da amônia total a partir de sua fração em água em detrimento das variações de pH em água doce, segundo Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA).



Fonte: (Usepa, 2013) adaptado.

A exposição de organismos aquáticos a concentrações de amônia elevadas gera uma série de complicações para a fisiologia de vertebrados (Mckenzie *et al.*, 2003) e invertebrados (Yu, J. *et al.*, 2019). A Compesa publicou em junho de 2015 que dos 25 municípios que estão inseridos e fazem uso dos recursos hídricos da bacia do rio Ipojuca apenas quatro tem serviço de esgotamento sanitário e mesmo assim este esgoto não é tratado e termina sendo despejado na bacia do rio Ipojuca. De acordo com a Secretaria de ciência, tecnologia e meio ambiente do estado de Pernambuco cerca de 67,3% da carga poluidora total remanescente é atribuída ao esgoto doméstico (Secta/Pnma, 2003) (Figura-12). Desta forma, boa parte da amônia presente nestes corpos hídricos é de fontes domésticas, sendo os efluentes agroindustriais responsáveis por 26,7% da amônia lançada para o rio.

Figura 12 – Emissário de esgoto doméstico desaguando no rio Ipojuca na região do município de Caruaru, próximo ao ponto conhecido como IP49 pela CPRH.



Fonte: Foto de Célio Mariz

A amônia ionizada NH_4^+ é menos potente que a amônia não ionizada NH_3 , que pode causar supressão imunológica em peixes (Goncalves *et al.*, 2017). NH_3 é responsável pela redução do desempenho natatória em salmonídeos (Mckenzie *et al.*, 2003) e por manter indivíduos de *Cyprinus carpio* em letargia (Israeli-Weinstein e Kimmel, 1998). Outros danos incluem aumento de cortisol, dano ao sistema nervoso central, hiperamonemia (Randall e Tsui, 2002; Feldman *et al.*, 2014). Estes efeitos tóxicos associados aos efeitos de outros contaminantes podem ser fatais para os organismos aquáticos.

1.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E ESTRESSE OXIDATIVO

1.6.1 Biotransformação

Os xenobióticos constituem uma gama enorme de contaminantes produzidos pelo homem e que em consideráveis concentrações ou doses podem ocasionar uma infinidade de distúrbios a homeostase de um organismo. Estes compostos quando entram em contato com seus respectivos sítios de ação desencadeiam uma série de atividades biológicas como uma

tentativa de excretar o composto. A biotransformação do composto em uma forma mais solúvel (processo catalisado por enzimas específicas) tem como objetivo a facilitação no processo de excreção do xenobiótico, através da hidrofilição do mesmo (Van Der Oost *et al.*, 2000).

O processo de detoxificação inclui as enzimas do complexo enzimático P450 e acontecem em sua maior parte nos hepatócitos (Stegeman *et al.*, 1997). Nos peixes as P450 que melhor expressam o processo são a família das enzimas CYP-1A que catalisam as reações de fase I que compreendem processos de oxidação do xenobiótico (Vuilleumier, 1997). A fase II no processo inclui a conjugação do xenobiótico com compostos endógenos ao organismo com a finalidade de facilitar ainda mais sua excreção. Dentre os compostos endógenos utilizados neste processo está a glutatona que é responsável por facilitar ainda mais o processo de excreção durante a fase II (Sheehan *et al.*, 2001).

As glutatona-S-transferases (GST) compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (Hayes *et al.*, 2005). Estas enzimas também atuam como antioxidantes na redução de eletrófilos produzidos a partir da oxidação da membrana (Huber *et al.*, 2008). O processo inclui a conjugação do xenobiótico oxidado na fase I e na maioria dos casos a proteína endógena, glutatona. O conjugado, então, passa a ser mais hidrossolúvel e mais facilmente excretável.

A avaliação na atividade da GST é bastante esclarecedora quando a possibilidade de contaminação por xenobióticos, visto que a enzima responde a diferentes grupos de contaminantes e poluentes. A exposição de *Pomatoschistus microps* a misturas de HPA podem induzir a atividade da GST (Vieira *et al.*, 2008), enquanto que a exposição de *Danio rerio* ao HPA fenantreno causa inibição (Mai *et al.*, 2019). Além disso, outros contaminantes como alguns metais (Long *et al.*, 2011), Dioxinas (Liu *et al.*, 2015) e amônia (Wang *et al.*, 2021) podem gerar alguma resposta por parte desta enzima.

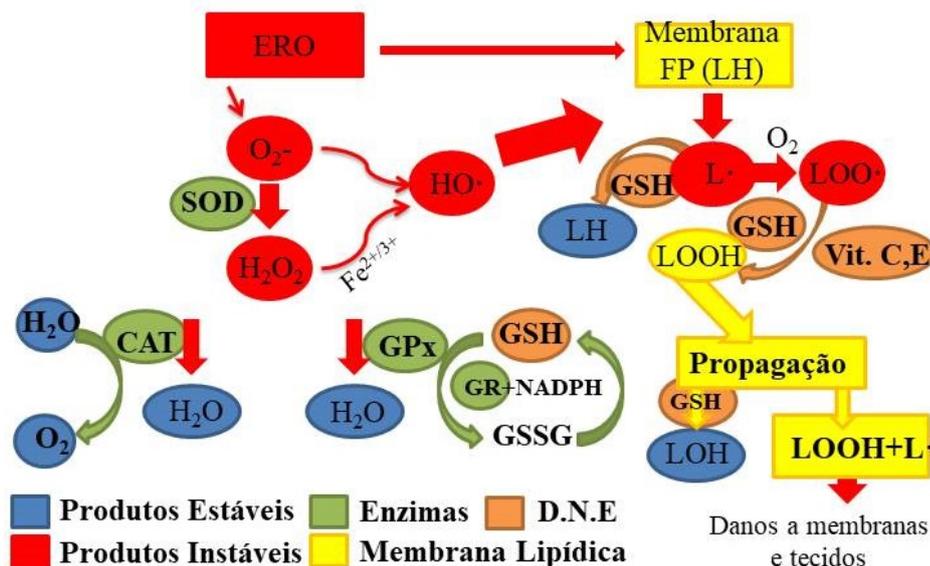
1.6.2 Espécies Reativas de Oxigênio

A partir do processo de metabolização celular é comum à produção de algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) que são rapidamente convertidas em moléculas não reativas para o organismo, no entanto quando o organismo é exposto a alguns xenobióticos a

concentração destas EROs aumentam em concentração. O problema com as EROs começa quando elas excedem o limite de conversão dos agentes antioxidantes, então dizemos que o organismo está passando por um quadro de estresse oxidativo. No momento em que se instala o estado de estresse oxidativo é comum que o organismo desenvolva uma série de alterações que se estendem do nível molecular, causando dano ao material genético (Bacchetta *et al.*, 2017), até o nível comportamental (Nunes *et al.*, 2008).

Dentre as diferentes espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo celular estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$), superóxido ($O_2\cdot^-$) e singlet oxigênio (1O_2) que não são tóxicos, mas reagem com moléculas biológicas (Apel e Hirt, 2004). A presença destas moléculas desencadeiam uma série de respostas biológicas acionando a produção de como a proteínas antioxidantes glutathiona (GSH), enzimas de defesa antioxidante como as superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-s-transferase (GST), além das vitaminas E e C (Di Giulio e Meyer, 2008) (Figura-13).

Figura 13- Esquema evidenciando os processos de defesa antioxidante e dano a membrana fosfolipídica. Defesa não enzimática (DNE) representada por proteína não enzimática e vitaminas, Vitaminas (Vit.). Membrana fosfolipídica (Membrana FP).



Fonte: Célio Mariz

1.6.3 Biomarcadores de defesa antioxidante

As defesas antioxidantes constituem um grupo de mecanismos compostos por vitaminas (vitamina C e vitamina E), enzimas (superóxido dismutase-SOD, a catalase-CAT e a glutathiona peroxidase-GPx) e outros componentes que atuam impedindo e ou na remediação

dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). O estado de estresse oxidativo representa um denominador comum, se não universal, da toxicidade que poderia levar a lesão tecidual e ameaçar a saúde do organismo (Gagné, 2014).

Além disso, a Glutationa (GSH) se apresenta como uma importante proteína não enzimática que auxilia e age por conta própria na redução das EROs (Sies, 1999). A GSH participa dos processos de transformação auxiliando as enzimas GPx e GST, além de por conta própria ceder elétrons para as diferentes espécies reativas e estabilizando os danos causados a membrana fosfolipídica (Figura-13). Após passar por este processo a GSH passa a ser glutatona oxidada (GSSG) que necessariamente precisa ser restabelecida sua integridade. A enzima responsável por este processo é a glutatona redutase (GR) que converte o GSSG em GSH utilizando o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH) que passa a ser oxidada (NADP⁺) (Huber *et al.*, 2008).

Dentre as defesas enzimáticas contra as EROs a catalase e a superóxido dismutase se apresenta como importantes enzimas de defesa endógenos do organismo para a redução destas espécies oxidativas. A enzima superóxido dismutase se apresenta como uma das primeiras defesas contra a espécie superóxido (O₂ •⁻). A SOD age transformando a O₂ •⁻ em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que por sua vez entra na rota da enzima catalase. A catalase age transformando o peróxido de hidrogênio em água e O₂. A partir das transformações exercidas sobre as EROs estas moléculas instáveis passam a adquirir a estabilidade.

1.6.4 Biomarcadores de danos oxidativos

O processo de oxidação do fosfolipídio inicia resulta em um radical lipídico (R •), que então sofre rearranjo para um radical dieno conjugado; sob condições aeróbicas típicas, este radical lipídico reagirá prontamente com O₂, produzindo um radical peroxil lipídico (ROO •) (Di Giulio e Meyer, 2008). O radical peroxil pode reagir com outros ácidos graxos monoinsaturados da membrana, abstraindo hidrogênio, tornando-se um peróxido de lipídio (LOOH) e gerando outro (R•) (Di Giulio e Meyer, 2008). A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos-, cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos, alguns destes são altamente genotóxicos (Huber *et al.*, 2008). O radical peroxil lipídico pode continuar a interagir em cadeia com outros ácidos graxos monoinsaturados da membrana, o que dá início a outra reação idêntica à ocorrida no fosfolipídio ao lado e assim sucessivamente.

O processo descrito está diretamente ligado a um dos processos mais comuns e que mais está envolvido com eventos de morte celular. O processo conhecido como peroxidação lipídica que ocorre em cadeia na membrana celular e que leva a apoptose. O dano celular causado pela exposição a diferentes contaminantes pode gerar estas moléculas. A amônia não ionizada induziu *Boleophthalmus pectinirostris* ao estado de estresse oxidativo gerando a molécula quantificável e indicadora de dano à membrana fosfolipídica, malondialdeído (MDA) (Wang *et al.*, 2021). Além de outros contaminantes como os fármacos (Yu, X. *et al.*, 2019), zinco (Zhao *et al.*, 2016) e misturas de HPA (Perrichon *et al.*, 2016) podem induzir organismos ao estado de estresse oxidativo e em consequência apresentarem danos a membranas celulares.

1.6.5 Biomarcador de neurotoxicidade

A acetilcolina é um neurotransmissor que está presente em todo o sistema nervoso central e periférico de vertebrados, além de também atuar no sistema nervoso autônomo, sendo seus receptores divididos em muscarínicos e nicotínicos (Picciotto *et al.*, 2012). Os receptores muscarínicos são receptores metabotrópicos que são estimulados pela acetilcolina e desencadeiam uma resposta pela ativação de canais iônicos enquanto que os receptores nicotínicos também colinérgicos estão relacionados ao sistema muscular, ganglionar e o sistema nervoso central.

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima que desempenha um papel principal na degradação do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas, está presente principalmente nas células nervosas, sua atividade determina o fim da resposta sináptica tanto no receptor muscarínico quanto no nicotínico (Picciotto *et al.*, 2012). A BChE ou pseudocolinesterase está presente principalmente no plasma sanguíneo, intestino e pâncreas. A BChE pode estar envolvida em vários processos, dentre eles está o processo de detoxificação, regeneração celular, proliferação celular, e na neurogênese de embriões (Mack e Robitzki, 2000).

A AChE comumente é utilizada como biomarcador da contaminação de afluentes por herbicidas de diferentes classes sendo os mais comuns organofosforados e os piretróides. Contudo peixes que estão expostos a afluentes contaminados por carbamatos, organofosforados, metais pesados, fenoxifenois, entre outros podem apresentar algum tipo de alteração na atividade desta enzima (Little *et al.*, 2008; Richetti *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2021). Alguns problemas na atividade normal da AChE podem causar perda de equilíbrio,

perda de apetite, problemas no comportamento evasivo problemas na performance natatória (Bretaud *et al.*, 2000; Johann *et al.*, 2020). Em Peixes, o sistema neuromuscular é principalmente colinérgico e o mau funcionamento pode ter sérias consequências no comportamento locomotor destes indivíduos (Payne *et al.*, 1996) através da hiperestimulação o que pode causar tetania, paralisia ou morte do indivíduo (Kirby *et al.*, 2000).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Manuscrito I

Título: Biomarcadores morfológicos, comportamentais e bioquímicos em *Danio rerio* como organismo sentinela para o Rio Ipojuca em região tropical.

1.7.1.1 Objetivo geral

Utilizar estágios iniciais de desenvolvimento do *Danio rerio* para avaliação espacial e temporal da toxicidade das águas superficiais ao longo do Rio Ipojuca, com base em efeitos letais e subletais no desenvolvimento embriolarval, comportamento natatório e nos biomarcadores bioquímicos glutathione-S-transferase (GST), Acetilcolinesterase (AChE).

1.7.1.2 Objetivo específico

- Avaliar efeitos letais em *Danio rerio* expostos por 96 h a partir do ovo fertilizado a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca.
- Avaliar alterações no desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio* expostos durante 96 h a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca com base no índice GMS e avaliação da frequência de patologias.
- Avaliar alterações nas frequências cardíacas de *Danio rerio* expostos durante 72 h a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca
- Avaliar alterações comportamentais na natação de *Danio rerio* expostos durante 7 dias a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca
- Avaliar alterações morfométricas em *Danio rerio* expostos durante 7 dias a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca
- Avaliar alterações bioquímicas nos biomarcadores enzimáticos GST e AChE em larvas de *Danio rerio* expostos durante 96 h a amostras de águas superficiais do Rio Ipojuca
- Avaliação a concentração de amônia tóxica nas amostras de água.

1.7.2 Manuscrito II

Título: Toxicidade letal e subletal de amônia não ionizada para o desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio*: biomarcadores bioquímicos, morfológicos e comportamentais.

1.7.2.1 Objetivo geral

Estabelecer a sensibilidade das fases iniciais de desenvolvimento de *D. rerio* a amônia não ionizada NH₃ em termos de efeitos tóxicos letais e subletais.

1.7.2.2 Objetivo específico

- Estabelecimento da concentração de NH_3 letal para 50% das larvas de *Danio rerio* expostas por período de 96 h após a fertilização ($\text{CL}_{50_{96\text{h}}}$).
- Avaliar alterações bioquímicas nos biomarcadores de neurotoxicidade acetilcolinesterase (AChE), defesa antioxidante glutationa-s-transferase (GST) e catalase (CAT), espécies reativas de oxigênio (ERO) em larvas de *Danio rerio* expostos durante 96 h a diferentes concentrações de NH_3
- Avaliar alterações no desenvolvimento embriolarval com o índice GMS e avaliação de patologias em larvas de *Danio rerio* expostos durante 96 h a diferentes concentrações de NH_3
- Avaliar alterações nas frequências cardíacas em larvas de *Danio rerio* expostos durante 72 h a diferentes concentrações de NH_3
- Avaliar alterações comportamentais na natação de *Danio rerio* expostos durante 7 dias a diferentes concentrações de NH_3
- Avaliar alterações morfométricas em *Danio rerio* expostos durante 7 dias a diferentes concentrações de NH_3

1.7.3 Manuscrito III

Título: A influência da cidade de Caruaru na contaminação e toxicidade das águas superficiais e sedimentos aquáticos do Rio Ipojuca.

1.7.3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da cidade de Caruaru na contaminação e toxicidade das águas superficiais e dos sedimentos aquáticos do rio Ipojuca, utilizando *D. rerio* para avaliação de efeitos letais e subletais através de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica.

1.7.3.2 Objetivo específico

- Avaliar efeitos letais em *Danio rerio* expostos por 96 h a partir do ovo fertilizado a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru.
- Avaliar alterações no desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio* expostos durante 96 h a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a

montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru, com base no índice GMS e avaliação da frequência de patologias.

- Avaliar alterações nas frequências cardíacas de *Danio rerio* expostos durante 48h e 72 h a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru
- Avaliar alterações comportamentais na natação de *Danio rerio* expostos durante 7 dias a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru
- Avaliar alterações morfométricas em *Danio rerio* expostos durante 7 dias a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru
- Avaliar alterações bioquímicas nos biomarcadores de neurotoxicidade acetilcolinesterase (AChE), defesa antioxidante glutathiona-s-transferase (GST) e catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona total (GSH), espécies reativas de oxigênio (ERO) e danos oxidativos a membranas pela quantificação de malondialdeído a amostras de águas superficiais e a elutriatos de sedimentos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru,
- Avaliação da concentração química de HPAs e de amônia não ionizada NH₃ nas amostras de água e elutriatos de sedimentos aquáticos do Rio Ipojuca a montante de Caruaru, na cidade de Caruaru e a jusante de Caruaru.

REFERÊNCIAS

AKITO, M. et al. Reevaluation of Minamata Bay, 25 years after the dredging of mercury-polluted sediments. **Mar Pollut Bull**, v. 89, n. 1-2, p. 112-120, Dec 15 2014. ISSN 1879-3363 (Electronic).

ALTENBUGER, R.; SEGNER, H.; OOST, R. V. D. Biomarkers and PAHs - Prospects for the Assessment of Exposure and Effects in Aquatic Systems. In: DOUBEN, P. E. T. (Ed.). **PAHs : an ecotoxicological perspective**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. p.297-328.

ALVES, R. N. et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224-230, 7// 2017. ISSN 0045-6535.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.

BACCHETTA, C. et al. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. **Ecological Indicators**, v. 76, p. 230-239, 5// 2017. ISSN 1470-160X.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.

BRASIL. **Resolução no. 357, 17 de março de 2005**. CONAMA. Brasília: Ministério do Meio Ambiente: 23 p. 2005.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.-P.; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 2, p. 117-124, 2000/10// 2000. ISSN 0147-6513.

BUSQUET, F. et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496-511, 8// 2014. ISSN 0273-2300.

CARVALHO, J. R. S. et al. Microaerated UASB reactor treating textile wastewater: The core microbiome and removal of azo dye Direct Black 22. **Chemosphere**, v. 242, p. 125157, 2020/03/01/ 2020. ISSN 0045-6535.

CASTRO, F. J. D. **Avaliação ecotoxicológica dos percolados de cinza de carvão e de solo com cinzas de carvão utilizando *Lactuca sativa* e *Daphnia similis* como organismos teste**. 2013. (Mestre). INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES USP, IPEN.

CHIU, M.-C. et al. Chapter 5.1 - Anthropogenic Threats to Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. In: DATRY, T.;BONADA, N., *et al* (Ed.). **Intermittent Rivers and Ephemeral Streams**: Academic Press, 2017. p.433-454. ISBN 978-0-12-803835-2.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008. ISSN 0100-4042.

CPRH. **RELATÓRIO DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**. Recife: 2014. 104.

_____. **3.5 Ipojuca**. Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH) 2018 www.CPRH.pe.gov.br, p.13. 2020a

_____. **3.5 Ipojuca.** Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH) 2019
www.CPRH.pe.gov.br, p.13. 2020b

CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, p. 69-78, 2008. ISSN 0100-4670.

DI GIULIO, R.; HINTON, D. Introduction. In: (Ed.). **The Toxicology of Fishes**: CRC Press, 2008. p.3-7. ISBN 978-0-415-24868-6.

DI GIULIO, R.; MEYER, J. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. In: (Ed.). **The Toxicology of Fishes**: CRC Press, 2008. cap. 6, p.273-324. ISBN 978-0-415-24868-6.

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**, v. 70, n. 1, p. 65-72, 7// 2010. ISSN 0141-1136.

FAIRCHILD, J. F. et al. Chronic Toxicity of Un-ionized Ammonia to Early Life-Stages of Endangered Colorado Pikeminnow (*Ptychocheilus lucius*) and Razorback Sucker (*Xyrauchen texanus*) Compared to the Surrogate Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 378-384, 2005/10/01 2005. ISSN 1432-0703. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0223-9> >.

FELDMAN, B.; TUCHMAN, M.; CALDOVIC, L. A zebrafish model of hyperammonemia. **Mol Genet Metab**, v. 113, n. 1-2, p. 142-7, Sep-Oct 2014. ISSN 1096-7206 (Electronic) 1096-7192 (Linking).

GAGNÉ, F. Chapter 6 - Oxidative Stress. In: GAGNÉ, F. (Ed.). **Biochemical Ecotoxicology**. Oxford: Academic Press, 2014. p.103-115. ISBN 978-0-12-411604-7.

GOMES, M. F. et al. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

GONCALVES, A. F. et al. Cortisol plays a role in the high environmental ammonia associated suppression of the immune response in zebrafish. **Gen Comp Endocrinol**, v. 249, p. 32-39, Aug 1 2017. ISSN 1095-6840 (Electronic) 0016-6480 (Linking).

GUPTA, R. C. et al. Chapter 37 - Organophosphates and Carbamates. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology (Third Edition)**: Academic Press, 2018. p.495-508. ISBN 978-0-12-811410-0.

HAGENAARS, A. et al. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 225-235, 2014/12/01/ 2014. ISSN 0166-445X.

HALLARE, A. V. et al. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Science of The Total Environment**, v. 347, n. 1, p. 254-271, 2005/07/15/ 2005. ISSN 0048-9697.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51-88, 2005. ISSN 0362-1642 (Print) 0362-1642.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498, 04/17/online 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008. ISSN 0100-4042.

INCARDONA, J. P.; LINBO, T. L.; SCHOLZ, N. L. Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, n. 2, p. 242-249, 12/1/ 2011. ISSN 0041-008X.

ISRAELI-WEINSTEIN, D.; KIMMEL, E. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. **Aquaculture**, v. 165, n. 1-2, p. 81-93, 1998. ISSN 0044-8486.

JOHANN, S. et al. Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. **Science of The Total Environment**, v. 709, p. 136174, 2020/03/20/ 2020. ISSN 0048-9697.

JOHNSON, L. et al. The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish from Puget Sound, Washington. In: (Ed.). **The Toxicology of Fishes**: CRC Press, 2008. p.877-923. ISBN 978-0-415-24868-6.

JØRGENSEN, S. E. Ecotoxicological Research- Historical Development and perspectives In: MARKERT, G. S. B. (Ed.). **Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects**, 1998. cap. 1, p.3-15. ISBN 978-0-471-17644-2.

KIRBY, M. F. et al. The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000/09/01/ 2000. ISSN 0025-326X.

LITTLE, D. C.; MILWAIN, G. K.; PRICE, C. 3 - Pesticide contamination in farmed fish: assessing risks and reducing contamination. In: LIE, Ø. (Ed.). **Improving Farmed Fish Quality and Safety**: Woodhead Publishing, 2008. p.71-96. ISBN 978-1-84569-299-5.

LIU, H. et al. A rapid in vivo zebrafish model to elucidate oxidative stress-mediated PCB126-induced apoptosis and developmental toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 91-102, 7// 2015. ISSN 0891-5849.

LIU, L. et al. Characterization of sediment toxicity in Shanghai Harbor using toxicity tests and digital gene expression analysis based on clams *Ruditapes philippinarum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111065, 2020/11/01/ 2020. ISSN 0147-6513.

LONG, Y. et al. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 153, n. 3, p. 310-7, Apr 2011. ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456 (Linking).

MACK, A.; ROBITZKI, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 6, p. 607-628, 2000/04/01/ 2000. ISSN 0301-0082.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C. **Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals**. Taylor & Francis, 1993. ISBN 9780873719735.

MAI, Y. et al. Histological, biochemical and transcriptomic analyses reveal liver damage in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to phenanthrene. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 225, p. 108582, Nov 2019. ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456 (Linking).

MCKENZIE, D. J.; SHINGLES, A.; TAYLOR, E. W. Sub-lethal plasma ammonia accumulation and the exercise performance of salmonids. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 135, n. 4, p. 515-526, 2003. ISSN 1095-6433.

NUNES, B. et al. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 341-354, 2008. ISSN 0147-6513.

PAYNE, J. F. et al. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996/02/01/ 1996. ISSN 0025-326X.

PERRICHON, P. et al. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel

approach. **Sci Total Environ**, v. 568, p. 952-966, Oct 15 2016. ISSN 1879-1026 (Electronic) 0048-9697 (Linking).

PICCIOTTO, MARINA R.; HIGLEY, MICHAEL J.; MINEUR, YANN S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012/10/04/ 2012. ISSN 0896-6273.

R. VAN DER OOST, C. P.-V., AND N.W. VAN DEN BRINK. Chapter three: Biomarkers in environmental assessment. In: P. J. DEN BESTEN, M. M. (Ed.). **Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends and Strategies**. Taylor e Francis Group: Teylor e Francis Group, 2016. cap. 3,

RAND;, G. M.; WELLS;, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Toxicology In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Assessment**. 2. USA: Taylor e Francis, 1995. cap. 1, p.3-68. ISBN 1-56032-091-5.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1–12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.

REDDY, K. R.; XIE, T.; DASTGHEIBI, S. PAHs removal from urban storm water runoff by different filter materials. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, v. 18, n. 2, 2014.

RICHETTI, S. K. et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 1, p. 116-122, 2011.

ROBERTS, D. A. Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. **Environ Int**, v. 40, p. 230-243, Apr 2012. ISSN 1873-6750 (Electronic) 0160-4120 (Linking).

SECTA/PNMA. **Levantamento das Fontes Poluidoras na Bacia do Rio Ipojuca** SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. M. A. D. P. Recife - PE: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco: 54 p. 2003.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical journal**, v. 360, n. Pt 1, p. 1-16, 2001. ISSN 0264-6021 1470-8728.

SIEBEL, A. M. B., CARLA. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Saúde** Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4o andar 04531- 934, São Paulo – SP – Brasil: Blücher, v.1, 2015. cap. 1, p.15-55. ISBN 978-85-212-0896-9.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 916-921, 1999/11/01/ 1999. ISSN 0891-5849.

STEGEMAN, J. J. et al. Cytochromes P450 (CYP) in Tropical Fishes: Catalytic Activities, Expression of Multiple CYP Proteins and High Levels of Microsomal P450 in Liver of Fishes From Bermuda. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 61-75, 1997/01/01/ 1997. ISSN 0742-8413.

USEPA. **Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Ammonia Freshwater - EPA 822-R-13-001**. Washington DC: USEPA, 2013. 255.

VAN DER OOST, R. et al. Validation of inland water pollution assessment using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 431-432, 2000.

VERGAUWEN, L. et al. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. **Chemosphere**, v. 139, p. 9-17, 2015.

VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of The Total Environment**, v. 395, n. 2, p. 87-100, 2008/06/01/ 2008. ISSN 0048-9697.

VUILLEUMIER, S. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 5, p. 1431-1441, 1997. ISSN 0021-9193 1098-5530.

WALKER, G. H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B., Ed. **Principles of Ecotoxicology**: Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.ed. 2005.

WANG, S. et al. Exogenous inositol ameliorates the effects of acute ammonia toxicity on intestinal oxidative status, immune response, apoptosis, and tight junction barriers of great blue-spotted mudskippers (*Boleophthalmus pectinirostris*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 240, p. 108911, 2021/02/01/ 2021. ISSN 1532-0456.

WÖLZ, J. et al. Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3327-3333, 2010/07/15/ 2010. ISSN 0048-9697.

YU, J. et al. Transcriptome analysis of oriental river Prawn (*Macrobrachium nipponense*) Hepatopancreas in response to ammonia exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 93, p. 223-231, 2019/10/01/ 2019. ISSN 1050-4648.

YU, X. et al. Tetracycline antibiotics as PI3K inhibitors in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative stress in zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 226, p. 696-703, 2019.

ZHAO, X. et al. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. **Aquat Toxicol**, v. 180, p. 56-70, Nov 2016. ISSN 1879-1514 (Electronic)0166-445X (Linking).

II MANUSCRITO I

Biomarcadores morfológicos, comportamentais e bioquímicos em *Danio rerio* como organismo sentinela para o Rio Ipojuca em região tropical.

RESUMO

O Rio Ipojuca recebe descargas de efluentes domésticos, agrícolas e industriais ao longo de seu curso de 320 km no sentido Oeste-Leste, e possui regime fluvial intermitente da nascente até as proximidades da cidade de Caruaru, a partir da qual segue seu fluxo de forma perene até o Oceano Atlântico. A rede de monitoramento de águas superficiais da Agência Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH) monitora a qualidade de água em 12 estações ao longo do Rio Ipojuca, mas há uma necessidade de caracterizar de forma mais abrangente a toxicidade de suas águas superficiais, uma vez que somente em alguns pontos a toxicidade no nível letal é avaliada usando como organismo teste o invertebrado aquático de água doce *Daphnia magna*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação espacial, ao longo de 7 estações, e temporal, entre maio de 2018 a novembro de 2019, da toxicidade letal e subletal de águas superficiais do rio Ipojuca utilizando fases iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio rerio*. Foi utilizada metodologia de exposição e avaliação de efeitos letais com base na OECD 236, e foram avaliados efeitos subletais no desenvolvimento embriolarval, juntamente com biomarcadores bioquímicos, morfológicos e comportamentais. Foi observada mortalidade significativa entre 50% e 100% em larvas expostas a águas superficiais da estação IP38, localizada em área rural ainda na porção intermitente do rio, e da estação IP55, na sua porção perene. A estação IP49 a jusante da cidade de Caruaru no início da porção perene se destacou por apresentar letalidade de 100% a *Danio rerio* na quase totalidade do período analisado. Além dos efeitos letais, o desenvolvimento embriolarval foi significativamente retardado comparado aos controles com base no índice morfológico geral nas larvas que sobreviveram à exposição à água das estações IP55, IP01, IP85, IP90, IP38, IP64 em 67%, 50%, 40%, 33%, 16% e 0% do período avaliado, respectivamente. A frequência das patologias relacionadas a déficit na absorção do saco vitelínico e falha no insuflamento da bexiga natatória foi significativamente aumentada comparada aos controles nas larvas que sobreviveram à exposição à água das estações IP01, IP38, IP55, IP64, IP85, IP90 em pelo menos 17% do período avaliado. A frequência de contrações ventriculares por segundo quantificadas em larvas expostas a água das estações IP01, IP38, IP49, IP55 e IP90

em novembro de 2019, foi reduzida. O comportamento destes organismos foi alterado principalmente nas estações mais críticas como IP38 e IP55, além do IP64 ter estado mais tempo em repouso relacionado ao controle $p \leq 0,05$. Os dados apresentados mostram que a água em todo o corpo hídrico apresenta algum nível de toxicidade e algumas das patologias são clássicas de determinados contaminantes que correlacionam o ambiente em que o trecho está inserido.

1. INTRODUÇÃO

As bacias hidrográficas são historicamente escolhidas como base para o estabelecimento de qualquer civilização, pela capacidade que os corpos hídricos locais possuem em abastecer os povos, favorecer o desenvolvimento de atividades agrícolas e receber os efluentes gerados pelos mesmos. Entretanto, o crescimento populacional exponencial desordenado tem elevado o potencial de escoamento de esgoto doméstico, efluentes líquidos industriais e lixiviação de nutrientes e agroquímicos para estes corpos hídricos a níveis insustentáveis (López-Doval et al., 2013; Wanhong et al., 2020).

Misturas cada vez mais complexas de contaminantes inorgânicos e orgânicos são tipicamente encontradas em áreas urbanas e rurais de rios, e a caracterização da qualidade ambiental destes ecossistemas aquáticos não pode ser efetivada somente com base em métodos químicos analíticos. Somente um número limitado de contaminantes pode tipicamente ser analisado, e potenciais interações entre os mesmos irão determinar o potencial tóxico destas misturas ambientais para as espécies aquáticas (van der Oost et al., 2020). Métodos de biomonitoramento da toxicidade em programas de controle da poluição química apresentam vantagens sobre o monitoramento químico, pois medem os efeitos tóxicos integrados dos contaminantes biodisponíveis nas concentrações encontradas nestas misturas complexas (R. van der Oost, 2016).

O rio Ipojuca localizado no nordeste do Brasil tem seu curso cortando diferentes cidades do estado de Pernambuco, sendo sua nascente na Serra do Pau D'arco, em Arcoverde. O rio possui 323 km orientados no sentido oeste-leste, possuindo regime intermitente e se tornando perene a partir da cidade de Gravatá. O rio deságua no Oceano Atlântico na cidade de Ipojuca, nas proximidades do Complexo Industrial Portuário de Suape. Ao longo de sua extensão sofre pressão de diferentes atividades antropogênicas, incluindo a indústria sucroalcooleira, pecuária, agroindústria, química, têxtil, metalúrgica, produtos farmacêuticos e veterinários, que juntamente com as pressões decorrentes das áreas urbanizadas e

esgotamento doméstico não tratado, fazem com que a qualidade de suas águas seja prejudicada (CPRH, 2014).

A agência pernambucana de meio ambiente (CPRH) monitora a qualidade das águas superficiais do Rio Ipojuca ao longo de 14 estações de coleta, utilizando métodos físicos, químicos e ecotoxicológicos. Níveis elevados de fósforo e amônia total são indicativos de atividades antropogênicas (Gikas et al., 2020), e têm sido detectados ao longo do rio. Dentro das análises empregadas pela Agência Ambiental de Pernambuco (CPRH) o índice de qualidade de águas (IQA) e índice de estado trófico (IET) são importantes ferramentas no entendimento das possíveis consequências da contaminação pelo esgoto doméstico. Segundo relatório sobre fontes poluidoras do rio Ipojuca (SECTA/PNMA, 2003) 67,3 % da carga poluidora lançada diariamente no rio corresponde aos esgotos domésticos. Já é sabido que o esgoto doméstico é responsável por cargas significativas de poluentes e contaminantes, como os fármacos contraceptivos (Reyhalian et al., 2011) e nitrogênio amoniacal que é tóxico para peixes (Randall and Tsui, 2002). Desta forma, a utilização de bioensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade destas águas pode ser uma ferramenta esclarecedora importante, visto que o rio Ipojuca possui 20,8% de seu volume captado e destinado ao consumo humano direto e 55,7% para uso animal e lavoura (PNMA, 2003).

O bioensaio ecotoxicológico realizado pela CPRH segue as normas para testes com *Daphnia magna* padronizado pela “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD), que se restringe a observação de efeitos agudos que são caracterizados pela imobilidade dos organismos após exposição a amostras de água por 48h (OECD, 2012). Este teste tem detectado efeitos tóxicos somente na estação de coleta a jusante da cidade de Caruaru, onde foi encontrada uma maior concentração de metais pesados (Soares de Mendonça, 2005b; da Silva et al., 2017). Apesar do ensaio com *Daphnia magna* ser útil para avaliação de ecotoxicidade, é desejável que organismos de diferentes níveis tróficos sejam utilizados nesta avaliação. Neste sentido, o uso de peixes como modelos para avaliação da ecotoxicidade letal e subletal de águas superficiais é também desejável, tendo em vista a importância ecológica e econômica do grupo (Christophe et al., 2015).

Os estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish *Danio rerio* se tornaram um importante modelo biológico de vertebrado utilizado para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento (Embry et al., 2010), possibilitando a avaliação simultânea de efeitos letais (OECD, 2013) e subletais no desenvolvimento embriolarval (Beekhuijzen et al., 2015),

bem como em biomarcadores bioquímicos (Maharajan et al., 2018) e comportamentais (Müller and van Leeuwen, 2004), úteis para a caracterização de mecanismos de toxicidade relevantes para o recrutamento de peixes. Desta forma, o objetivo deste trabalho é utilizar de estágios iniciais de desenvolvimento do *Danio rerio* como modelo ecotoxicológico para avaliação espacial e temporal da toxicidade das águas superficiais ao longo do rio Ipojuca. Serão avaliados efeitos letais e subletais no desenvolvimento embriolarval, comportamento natatório e nos biomarcadores bioquímicos glutathione-S-transferase (GST), Acetilcolinesterase (AChE).

2. METODOLOGIA

2.1. ÁREA DE ESTUDO E ESTAÇÕES DE COLETA DE ÁGUA SUPERFICIAL

A Figura 1 indica as diferentes estações de coleta focadas neste estudo. A estação de coleta IP01 está localizada na cidade de Arcoverde. Segundo o IBGE em 2019 a população de Arcoverde era de 74.338 habitantes correspondendo a 196,05 habitantes/ Km² em 2010, ainda segundo o IBGE, havia um total de 86,4% de esgotamento sanitário adequado apesar de só haver uma unidade de tratamento de esgotamento sanitário.

A estação IP38 fica localizada a montante da cidade de São Caitano, em meio ao Agreste pernambucano, próximo à fazenda Pato Branco na chamada passagem molhada. A cidade de São Caetano possui uma população de 35.274 habitantes e uma densidade demográfica de 92 habitantes/ Km² segundo o IBGE em seu último censo de 2010. A cidade conta com abastecimento de água fornecido pela Compesa e 50,2 % da população conta com esgotamento sanitário completo, ainda de acordo com o IBGE em seu censo de 2010.

O IP49 é o ponto mais problemático do Rio Ipojuca se localizando a jusante da cidade. O trecho do rio que ainda não é perene nos períodos mais secos do ano é alimentado pela água do esgoto oriunda da cidade, sendo a área que apresenta os maiores picos de amônia segundo relatórios semestrais da CPRH. Com uma População de 314.912 habitantes, a cidade de Caruaru no Agreste pernambucano possui densidade demográfica de 342,07 habitantes por Km² além de ser detentora de grandes polos industriais, relacionados às indústrias têxteis que só se expandem além do envolvimento direto no setor terciário no que diz respeito à cultura e festividades. A cidade possui 81,3% de seu esgotamento sanitário adequado, um dos maiores de Pernambuco, segundo IBGE.

A estação de coleta IP55 está localizada a montante da cidade de Gravatá no Agreste pernambucano. Neste ponto o rio já possui regime perene. A cidade de Gravatá conta com uma população de 76.458 habitantes, com uma densidade demográfica de 150,87 habitantes por Km² e esgotamento sanitário adequado para 65% da população, segundo o censo de 2010 do IBGE.

A estação de coleta IP64 está localizada a jusante da cidade de Chã Grande no Agreste de pernambucano e conta com uma população de 20.107 habitantes e com densidade demográfica de 237,33 habitantes por Km² segundo o censo do IBGE de 2010. A cidade tem 47,5% do esgoto adequadamente tratado ainda segundo o IBGE em seu ultimo censo de 2010.

A estação de coleta IP85 está localizada a jusante da cidade de Escada na Zona da Mata-Sul pernambucana. A cidade possui uma população de 63.517 habitantes e uma densidade demográfica de 183,07 habitantes por Km² segundo o censo do IBGE de 2010. A cidade conta com um sistema completo de esgotamento doméstico para 37% da população. A cidade está diretamente ligada à produção de açúcar e álcool, além da produção de inox e monocultura de cana de açúcar.

A estação de coleta IP90 está localizada a montante da região metropolitana do Recife (PE), na cidade de Ipojuca, próximo a uma usina de produção de cana. A cidade conta com uma população de 8.637 segundo o censo de 2010 pelo IBGE. A cidade possui uma densidade demográfica de 152,98 habitantes por Km², segundo o censo do IBGE de 2010 além da cidade contar com esgotamento adequado para 50,3% da população, segundo o IBGE.

As amostras de água superficial foram coletadas pela CPRH com balde de aço inoxidável nas diferentes estações de coleta em maio (T1), outubro (T2) e novembro de 2018 (T3) e maio (T4), outubro (T5) e novembro de 2019 (T6), armazenadas em frascos âmbar com um volume de 1 L, e transportadas em gelo para o laboratório onde foram armazenadas refrigeradas a 4 °C por no máximo sete dias até o início dos testes ecotoxicológicos. As medidas pluviométricas foram obtidas através dos boletins meteorológicos da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC) (Tabela 1).

Figura 1. Estações de coleta de água superficial do Rio Ipojuca utilizadas neste trabalho, parte da Rede de Monitoramento de Qualidade de Águas da Agência Ambiental de Pernambuco (CPRH).

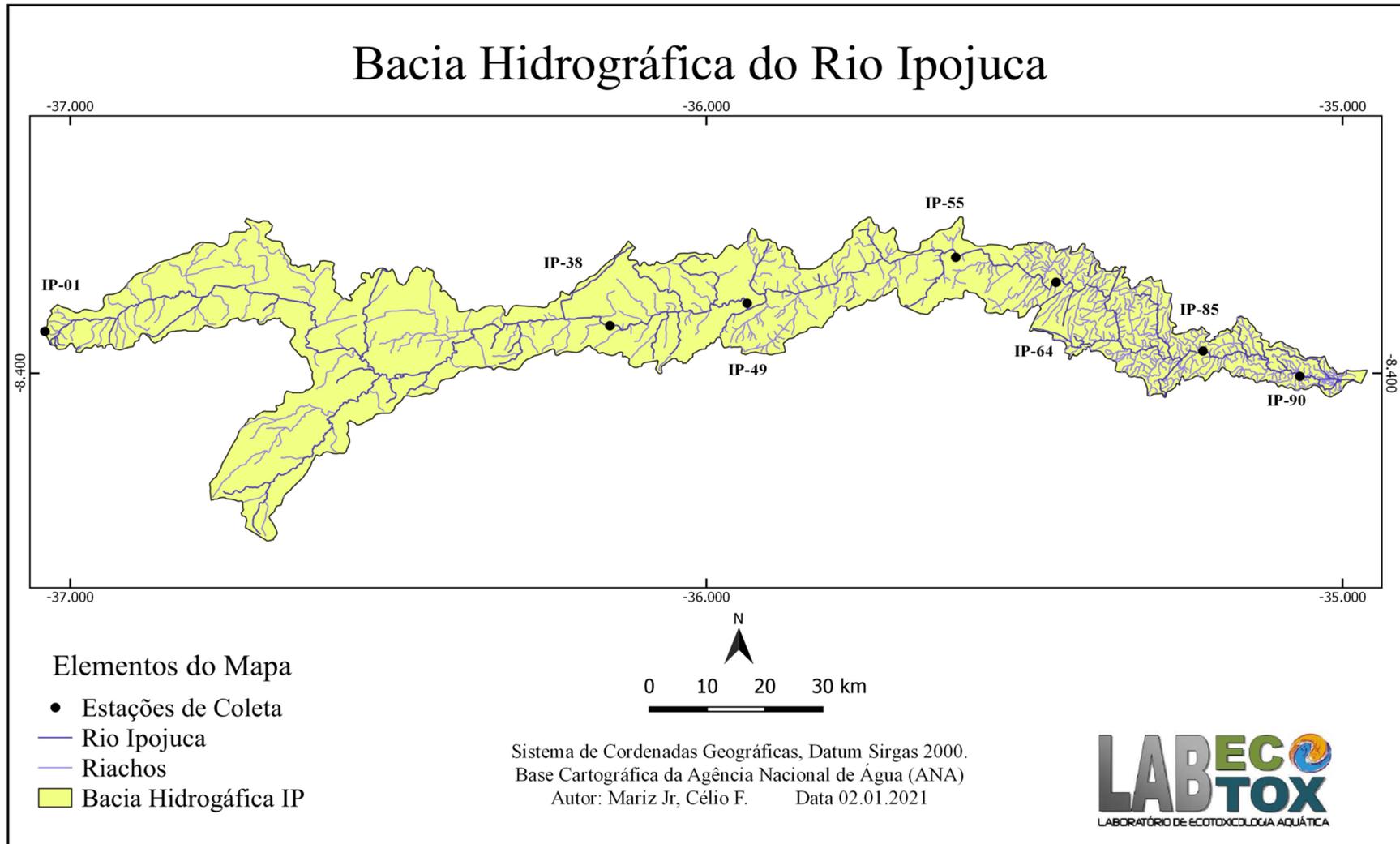


Tabela 1. Caracterização climática e pluviométrica (mm) das estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca

Mesoregiões	Estação	05.2018		08.2018		11.2018		05.2019		08.2019		11.2019	
Sertão de Moxotó	IP01	50,2	S	5,3	MS	31,0	N	21,6	S	81,0	C	7,0	MS
Agreste central	IP38	16,0	N	0,0	MS	1,0	N	17,0	N	72,5	MC	0,0	MS
Agreste central	IP49	51,7	N	11,6	MS	4,05	N	47,15	N	63,45	MC	0,0	MS
Agreste central	IP55	57,8	N	2,5	MS	8,0	N	17,0	N	55,2	MC	0,0	MS
Agreste Setentrional	IP64	119,9	N	49,9	MS	40,1	N	124,1	S	131,8	C	0,3	MS
Mata/Litoral	IP85	158,7	S	50,4	MS	25,0	C	135,1	S	180,2	C	0,0	MS
Mata/Litoral	IP90	207,0	S	80,8	MS	42,6	C	215,4	S	180,5	C	7,2	MS

(MS) muito seco, (S) seco, (N) normal para a estação, (C) chuvoso e (MC) muito chuvoso, dados obtidos de (APAC, 2019, 2020).

2.2. CULTIVO DOS ORGANISMOS E EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL

Peixes adultos cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) da espécie *Danio rerio* foram mantidos em aquários de 100 L, e os padrões de qualidade da água de cultivo mantiveram-se constantes, com a concentração da amônia total abaixo 0,2 mg L⁻¹, pH entre 6,5 e 7,5, oxigênio dissolvido 6,0 ± 0,4 mg L⁻¹ (média ± desvio padrão) temperatura 28 ± 0,5 °C (média ± desvio padrão). A alimentação diária dos adultos reprodutores ocorreu quatro vezes ao dia com ração com 40% de proteína de peixe e náuplios recém-eclodidos vivos de *Artemia salina*.

Para a obtenção dos ovos fertilizados, três fêmeas maduras e seis machos foram transferidos para um aquário de desova (15 L de volume) na tarde do dia anterior ao início do experimento. Após a desova e fertilização ao amanhecer, foi realizada uma triagem e seleção de ovos fertilizados e viáveis por observação direta em um estereomicroscópio Zeiss ® com 50 X de magnificação. A taxa de fertilização foi superior a 90%. O sistema de exposição seguiu as normas da OECD 236 (OECD, 2013), e os ovos viáveis foram dispostos em placas de cultivo de células com 24 poços, 20 indivíduos expostos em uma placa para cada estação de coleta, sendo quatro indivíduos mantidos como controles internos. O volume da amostra de cada tratamento adicionado em cada poço foi de 2,5 mL, sendo que 2 mL foram substituídos a cada 24 h. As amostras foram aeradas antes da troca de 2,5 mL visando manter os níveis de oxigênio dissolvido acima de 5 mg L⁻¹, visto que em alguns pontos os níveis de oxigênio dissolvido eram menores que esse valor, de forma a assegurar que qualquer efeito tóxico não estivesse relacionado a baixas concentrações de O₂ dissolvido.

2.3. TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

A letalidade foi computada seguindo as normas da OECD 236 (OECD, 2013). Foram computados como letalidade os seguintes parâmetros: coagulação, ausência de somitos 24 horas pós-fertilização (hpf), ausência de batimentos cardíacos ao final de 48 hpf e ausência do destacamento caudal 48 hpf.

2.4. GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS)

Ao longo do período de exposição de 96 h, foi quantificado para cada larva o índice de desenvolvimento morfológico (*General Morphology Score* – GMS) (Beekhuijzen et al., 2015). O GMS se baseia na atribuição de pontos ao embrião/ larva observada durante seu desenvolvimento conforme estruturas morfológicas importantes são formados entre 0 e 96

hpf. Cada embrião/ larva de cada tratamento foi avaliada para presença destas características em estereomicroscópio Zeiss® com aumento entre 5 X e 80 X, entre 0 e 96 hpf. Ao final das 96 h de exposição uma larva perfeita apresenta um GMS igual a 17. Neste trabalho o marco morfológico insuflamento da bexiga natatória não previsto por (Beekhuijzen et al., 2015) também foi avaliado em 96 hpf, e portanto o valor máximo do GMS para uma larva perfeita foi igual a 18 pontos. A redução dos valores do GMS indica atrasos no desenvolvimento embriolarval.

2.5. FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO

A frequência das seguintes patologias ou anomalias morfológicas foi computada para cada grupo de 20 larvas expostas às amostras de água superficial a partir da fertilização dos ovos. Após 24h da fertilização (24 hpf): % de larvas com ausência de circulação, 48h após a fertilização (48 hpf): % de eclosão prematura, 72 hpf: % de larvas com ausência de nadadeira peitoral, 96 hpf: % de larvas com edema, % de larvas com déficit na absorção do saco vitelínico, % de larvas sem bexiga natatória insuflada.

2.6. FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES

A frequência cardíaca foi quantificada nas larvas em 72 hpf. Neste período, o organismo já está com o coração formado possibilitando a observação. As observações são feitas em microscópio invertido DIGILAB® utilizando um aumento de 20 X. A quantificação foi realizada pela contagem do número de contrações ventriculares em um período de 30 segundos com o auxílio de um cronômetro, em um total de 10 indivíduos para cada amostra de água superficial.

2.7. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA

As larvas sobreviventes em 168 hpf foram transferidas individualmente para poços de placas de cultivo de células de 12 poços com 3 mL de água limpa. Cada larva foi filmada durante 5 minutos (300 s), em visão superior usando câmeras de vídeo (modelo VP600H, Intellbras®, São José, Brasil) com lentes de zoom variável de 6-60 mm, e os vídeos gravados em computador através de placa de captura Geovision® modelo GV900A. A velocidade média de natação (cm s^{-1}) realizada pelas larvas durante o período monitorado foi calculada pelo software de rastreamento Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking – Smart® (PanLabs, Harvard Apparatus, EUA).

2.8. PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S

O tempo total de 300 s de monitoramento de cada larva individualmente também foi analisado em 30 intervalos sequenciais de 10 s separados, dentro dos quais foi quantificado o número de s que a larva permaneceu em repouso (velocidade $\leq 0,05 \text{ cm s}^{-1}$), o número de s que a larva nadou em velocidade lenta (entre 0,05 e 0,5 cm s^{-1}), e o número de s que o indivíduo nadou em velocidade rápida ($> 0,5 \text{ cm s}^{-1}$). Para tal também foi utilizado o software Smart, e as faixas de velocidade nas categorias repouso, lenta e rápida foram previamente estabelecidas em experimentos preliminares com larvas controle. Um total de 48 larvas em média do grupo controle, 20 larvas ou as sobreviventes expostas à água superficial da estação IP01, IP38, IP55, IP64, IP85, IP90 nas amostras de maio de 2018, agosto de 2018, novembro de 2018, maio de 2019, agosto de 2019 e novembro de 2019 foram analisadas. Para os grupos de larvas controle e larvas expostas à água das estações acima foi calculado o % de tempo que as larvas permaneceram em repouso, % de tempo que as larvas nadaram lentamente, e o % de tempo que as larvas nadaram rapidamente em cada intervalo de 10s. As médias deste % de tempo em cada classe de velocidade a cada intervalo foi plotada num gráfico de barras sobrepostas.

2.9. MEDIDA MORFOMÉTRICA

Ao final dos testes comportamentais para avaliação de velocidade natatória, as larvas foram fotografadas com uma câmera Cannon® PowerShot G10 acoplada em lupa Zeiss® Stemi 2000 C, utilizando aumento de 20 X. O comprimento total larval foi medido com uma precisão de 0,1 mm com o software AxioVision (Zeiss®).

2.10. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

O método para leitura da atividade da GST foi adaptado pra microplaca por (Habig et al., 1974). Para cada réplica amostral indivíduos expostos a água superficial, foram homogeneizados pools de quatro larvas com 168 hpf em 100 μL de tampão fosfato de potássio (KPI 0,25 M com pH 7,4) refrigerado e mantido sob gelo, seguido de centrifugação por 4 min em centrífuga refrigerada a 4°C a 3000g. A atividade da GST foi determinada a partir da conjugação da glutathiona (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado a 340 nm no espectrofluorímetro, SpectraMax® M3, e o cálculo foi baseado no coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Proteínas totais foram quantificadas pelo método (Bradford, 1976), e a atividade enzimática foi expressa em $\text{nmol CNDB min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$.

2.11. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (AChE)

O método para quantificação da atividade da acetilcolinesterase foi adaptado para microplacas por (Ellman et al., 1961). A amostra utilizada foi a mesma utilizada para a leitura da GST. O princípio da atividade se baseia na quantificação da cor amarelada produzida pela tiocolina quando reage com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB), formando o tiolato (TNB) quantificado por absorvância num espectrofluorímetro SpectraMax® M3 utilizando um comprimento de onda de 415 nm. O cálculo foi baseado no coeficiente de absorvância molar ($\epsilon=14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade foi expressa em $\text{nmol TNB min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

2.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A avaliação de diferenças estatísticas nas taxas de mortalidade e frequência de anormalidades de *Danio rerio* exposto às águas superficiais das diferentes estações de coleta comparadas com o controle foi feita mediante teste-t para proporções entre 2 amostras utilizando o software *Statistic Calculator* (StatPac, Northfield, USA). A avaliação de diferenças estatísticas comparadas com o controle no índice morfológico geral, frequência cardíaca, comprimento total, velocidade natatória espontânea média de *Danio rerio* exposto às águas superficiais das diferentes estações de coleta foi feita mediante análise de variância de um fator quando foi confirmada normalidade dos dados e homoscedasticidade, ou pelo teste Kruskal-Wallis quando estes pré-requisitos não foram confirmados. O número de segundos do total de 10s em cada intervalo avaliado que as larvas dos diferentes tratamentos (controle e expostos às águas superficiais de cada estação) permaneceram em repouso, desenvolveram velocidade lenta ou desenvolveram velocidade rápida foi analisado por análise de variância de 1 fator. Quando foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (larvas expostas às águas superficiais das diferentes estações e controles), as comparações entre tratamentos e controle foram feitas com base nos testes a posteriori de Dunnett (ANOVA) e Dunn (Kruskal Wallis), respectivamente, utilizando o software *Sigmaplot* 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha).

3. RESULTADOS

3.1. TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

Foram verificadas taxas de mortalidade superiores a 30% nas larvas expostas às águas superficiais das estações de coleta IP38 em T3 (55% de mortalidade) e T4 (100% de mortalidade), todas significativamente diferentes das larvas controle (t-test, $p < 0,05$) (Tabela 2). Foram observadas taxas de mortalidades iguais ou superiores a 30% em todos os pontos coletados em T3, período de chuvas normal segundo (APAC 2019) (Tabela 1), significativamente superiores à mortalidade dos controles (t-test, $p < 0,05$). Não foi verificada mortalidade significativamente diferente dos controles nos dois anos de coleta nas larvas expostas a água superficial da estação IP01. As taxas de mortalidade das larvas expostas à água da estação IP49 se destacaram e foram iguais a 100% em todas as coletas, exceto em T5, igual a 85%. Em T3 a taxa de letalidade das larvas expostas à água de IP49 também foi avaliada após diluições de 50%, 25% e 12,5% da água superficial coletada, e foram verificadas taxas de mortalidade de 90%, 15% e 0%, respectivamente, sendo que na diluição 25% não foi verificada diferença significativa relativa aos controles. Desta forma, a concentração de efeito não observado (CENO) para letalidade de IP49-T3 foi igual a 25%, correspondente a um fator de diluição (FD) igual a 4. Em T4 a taxa de letalidade das larvas expostas à água de IP49 também foi avaliada após diluição de 50%, em que a taxa de mortalidade reduziu para 0% e não foi estatisticamente diferente do controle, correspondendo a um FD igual a 2. Em T6 a taxa de letalidade das larvas expostas à água de IP49 também foi avaliada após diluição de 33%, em que a taxa de mortalidade reduziu para 0% e não foi estatisticamente diferente do controle, correspondendo a um FD igual a 3.

Tabela 2. Taxa de mortalidade (%) dos embriões e larvas de *Danio rerio* expostos às águas superficiais das estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca por 96 h.

Data de Coleta		C	IP01	IP38	IP49	IP49.2	IP49.3	IP49.4	IP49.8	IP55	IP64	IP85	IP90
Maio.2018	T1	4,17%	10,0%	5,0%	100%*	-	-	-	-	-	10,0%	10,0%	15,0%
Agosto.2018	T2	10,47%	5,0%	20,0%	100%*	-	-	-	-	25,0%	35,0%*	5,0%	25,0%
Novembro.2018	T3	0,0%	-	55,0%*	100%*	90,0%*	-	15,0%	0,0%	40,0%*	-	50,0%*	30,0%*
Maio.2019	T4	1,39%	-	100%*	100%*	0,0%	-	-	-	100%*	-	-	10,0%
Agosto.2019	T5	0,0%	5,0%	0,0%	85,0%*	-	-	-	-	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Novembro.2019	T6	6,25%	5,0%	5,0%	100%*	-	0,0%	-	-	0,0%	-	5,0%	0,0%

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.3: Amostras de água diluídas 33,3%; IP49.4: Amostra diluída 25%; IP49.8 e Amostra diluída 12,5%.

3.3. GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS)

A mediana do índice de desenvolvimento morfológico (GMS) foi reduzida relativa aos controles, indicando atraso no desenvolvimento embriolarval, nas larvas expostas a água da estação IP01 em T1, T5 e T6 (Figuras 2 e 3). As larvas expostas às águas da estação de coleta IP38 T4 diluídas 50%, e em T5 apresentaram mediana no GMS estatisticamente menor que o controle. As medianas do GMS das larvas expostas às diluições 50%, 25%, 6,25% e 3,13% do IP49 em T3, às diluições de 50% e 25% do IP49 em T4, a água bruta do IP49 em T5, e à diluição de 33% do IP49 em T6 foram menores que as medianas do controle (Figuras 2 e 3). As medianas do GMS das larvas expostas a águas do IP55 foram menores que as medianas do controle em T3, T4, T5 e T6. As larvas expostas às amostras da estação IP64 não apresentaram redução no GMS em nenhuma das amostras. As medianas do GMS das larvas expostas a águas do IP85 foram menores que as medianas do controle em T3 e T5. As medianas do GMS das larvas expostas a águas do IP90 foram menores que as medianas do controle em T2 e T5.

Figura 2. Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de *Danio rerio* expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca. Painéis

A: (Kruskall Wallis, $H = 57,1$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$);

B: (ANOVA, $F = 2,7$, $p = 0,017$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$);

C: (Kruskall Wallis, $H = 65,5$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$): maio de 2018, outubro de 2018 e novembro de 2018, respectivamente. C: controle, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.4: Amostras de água diluídas 25%; IP49.8: Amostra diluída 12,5%; IP49.16: Amostra diluída 6,25% e IP49.32: Amostra diluída 3,13%.

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.

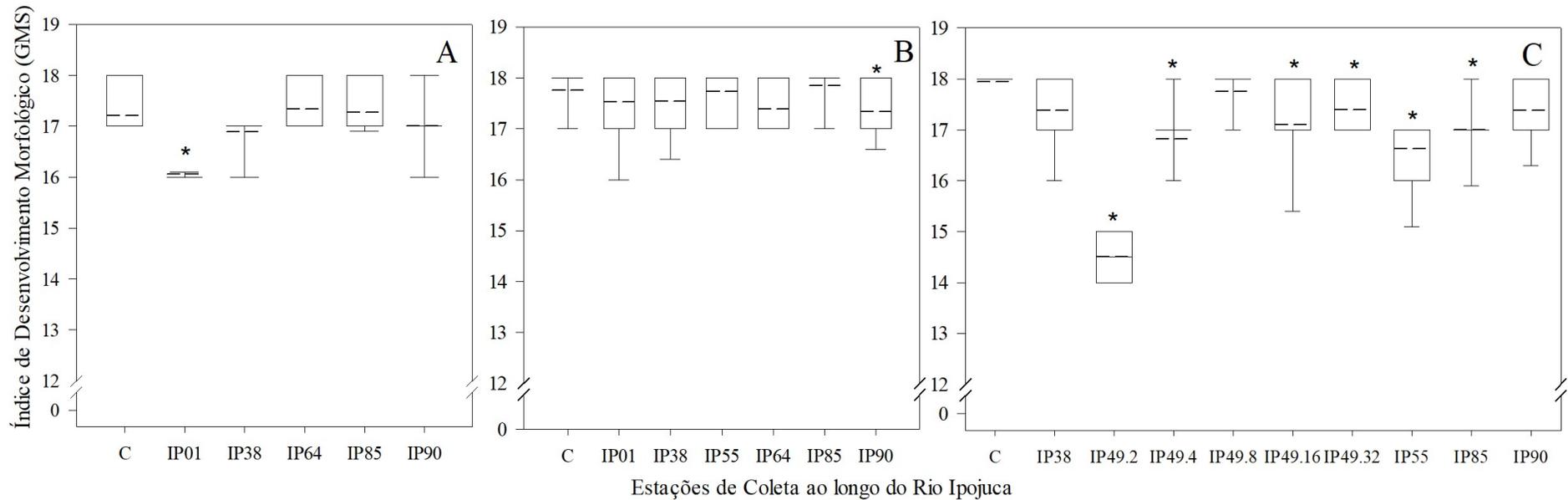


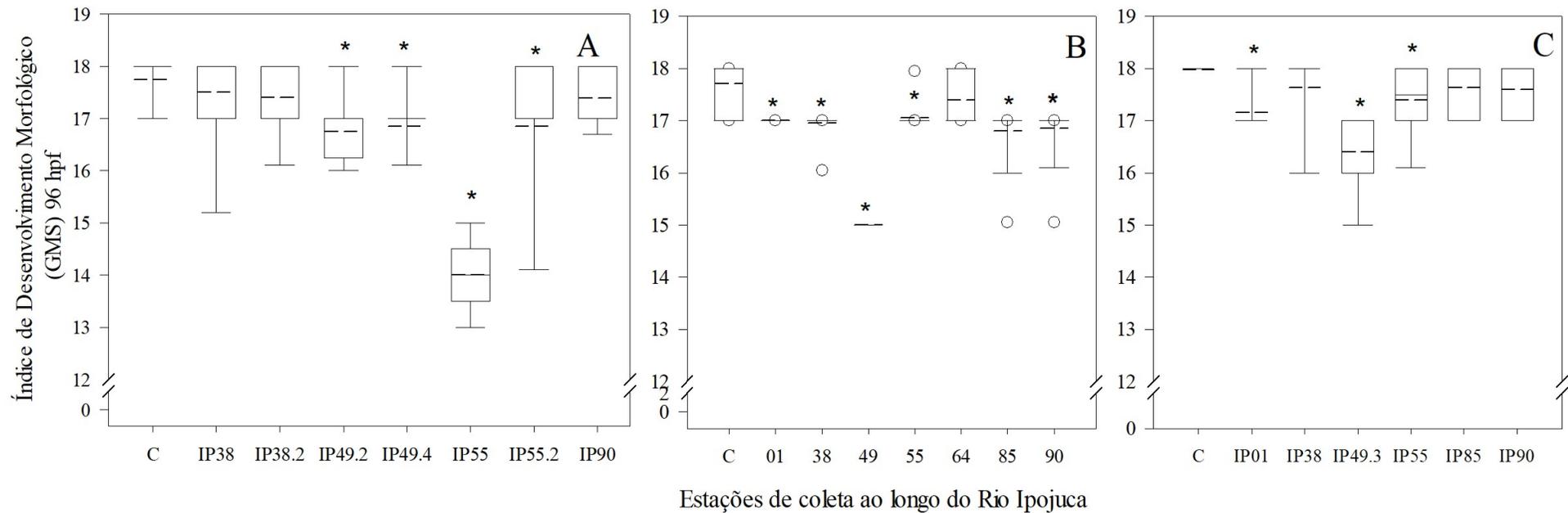
Figura 3. Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de *Danio rerio* expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca. Painéis

A: (Kruskall Wallis, $H = 66,5$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$);

B: (Kruskall Wallis, $H = 91,3$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$);

C: (Kruskall Wallis, $H = 73,0$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunn, $p < 0,05$): maio de 2019, outubro de 2019 e novembro de 2019, respectivamente. C: controle, IP38.2, IP49.2 e IP55.2: amostras diluídas 50%; IP49.3: amostra diluída 33,3% e IP49.4: Amostras de água diluídas 25%.

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.4 FREQUÊNCIAS DE ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS E DO DESENVOLVIMENTO

As anormalidades mais expressivas encontradas para as amostras de 2018 (Tabela 3A) foram atrasos no desenvolvimento da boca protrusível em T3, observadas em 100% das larvas expostas a IP49 (diluição 50%) e em 25% das larvas expostas a IP55. Em T3, 100% das larvas expostas a IP49.2 (diluição 50%) em T3, e 41% das larvas expostas a IP49.4 (diluição 25%) apresentaram falha no insuflamento da bexiga. A falha na absorção do saco vitelínico foi um problema frequente e detectado em T3 em 100% das larvas expostas a IP49.2 (diluição 50%) e em 41% das larvas expostas a IP49.4 (diluição 25%). A frequência de larvas eclodindo precocemente em T3 foi significativa, sendo verificada em 75% e 71% das larvas expostas a IP55 e IP85 (Tabela 3A).

Em 2019 (Tabela 3B), 75% das larvas expostas a IP49.4 (diluição 25%) em T4, 100% das larvas expostas a IP49 (sem diluição) em T5, e 100% das larvas expostas a IP49.3 (diluição 33%) em T6 apresentaram falha no insuflamento da bexiga. Frequências elevadas de larvas (entre 30% e 63%) com falha no insuflamento da bexiga também foram verificadas em 2019 após exposição à água de IP01, IP38 e IP55. Frequências significativas de larvas com falha na circulação (entre 25% e 30%) foram verificadas após exposição a IP55 em T3 e a IP49 em T4. Eclusão prematura foi verificada em 70% e 100% das larvas expostas a IP01 e a IP49.3 (diluição 33%), respectivamente.

Tabela 3A. Frequência (%) de patologias em larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição às águas superficiais do rio Ipojuca.

Pontos	Nº	Edemas	Hemorragias	Ausência das nadadeiras	Desenvolvimento da boca atrasada	Saco vitelínico não absorvido	Bexiga não insuflada	Eclosão prematura	Ausência de Circulação
Controle-T1	46	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%	0,0%	0,0%
IP01-T1	18	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	94,4%*	100%*	0,0%	5,6%
IP38-T1	19	0,0%	31,6%*	0,0%	0,0%	5,3%	100%*	0,0%	0,0%
IP49-T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IP64-T1	18	0,0%	5,6%	0,0%	0,0%	61,1%*	0,0%	0,0%	0,0%
IP85-T1	18	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	61,1%*	0,0%	0,0%	0,0%
IP90-T1	17	0,0%	0,0%	0,0%	5,9%	76,5%*	5,9%*	5,9%	0,0%
Controle-T2	22	2,0%	0,0%	0,0%	8,7%	4,5%	2,0%	13,6%	0,0%
IP01-T2	19	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	26,3%	15,8%	0,0%	0,0%
IP38-T2	16	0,0%	0,0%	0,0%	6,3%	18,8%	12,5%	25,0%	0,0%
IP49-T2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0%
IP55-T2	15	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%
IP64-T2	13	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	38,5%*	23,1%	7,7%	0,0%
IP85-T2	19	0,0%	0,0%	0,0%	10,5%	0,0%	5,3%	5,3%	0,0%
IP90-T2	15	0,0%	0,0%	0,0%	6,7%	0,0%	13,3%	46,7%*	0,0%
Controle-T3	13	0,0%	0,0%	7,7%	7,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
IP38-T3	13	0,0%	0,0%	7,7%	12,5%	7,7%	7,7%	15,4%	0,0%
IP49-T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IP49.2-T3	2	100%*	50,0%*	0,0%	100%*	100%*	100%*	0,0%	0,0%
IP49.4-T3	17	0,0%	0,0%	5,9%	11,8%	41,2%*	41,1%*	11,8%	0,0%
IP49.8-T3	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	20,0%	0,0%
IP49.16-T3	19	0,0%	0,0%	5,3%	15,8%	10,5%	10,5%	42,1%*	0,0%
IP49.32-T3	20	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%	0,0%	0,0%	45,0%*	0,0%
IP55-T3	16	0,0%	0,0%	12,5%	25,0%	6,3%	0,0%	75,0%*	0,0%
IP85-T3	14	0,0%	0,0%	7,1%	14,3%	7,1%	0,0%	71,4%*	0,0%
IP90-T3	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	25,0%	0,0%

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP4.4B: Amostras de água diluídas 25%; IP49.8: Amostra diluída 12,5%; IP49.16: Amostra diluída 6,25% e IP49.32: Amostra diluída 3,13%.

Tabela 3B. Frequência (%) de patologias em larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição às águas superficiais do rio Ipojuca.

Pontos	Nº	Edemas	Hemorragias	Ausência das nadadeiras	Desenvolvimento da boca atrasada	Saco vitelínico não absorvido	Bexiga não insuflada	Eclosão prematura	Ausência de Circulação
Controle-T4	23	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
IP38-T4	20	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	30,0%*	0,0%	0,0%
IP38,2-T4	20	0,0%	5,0%	0,0%	5,0%	0,0%	35,0%*	0,0%	0,0%
IP49-T4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IP49,2-T4	20	10,0%	0,0%	0,0%	5,0%	10,0%	70,0%*	5,0%	5,0%
IP49,4-T4	20	5,0%	0,0%	5,0%	0,0%	5,0%	75,0%*	0,0%	5,0%
IP55-T4	9	35%*	10,0%	25%*	35,0%	45,0%*	45,0%*	0,0%	30,0%*
IP55,2-T4	20	15,0%	10,0%	5,0%	20,0%	20,0%*	20,0%*	0,0%	15,0%
IP90-T4	18	5,6%	5,6%	0,0%	0,0%	61,1%*	16,6%	0,0%	0,0%
Controle-T5	48	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	27,1%	2,1%
IP01-T5	19	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	70,0%*	0,0%
IP38-T5	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,6%
IP49-T5	3	33,3%*	33,3%*	0,0%	0,0%	66,7%*	100%*	100%*	25,0%*
IP55-T5	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%
IP64-T5	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
IP85-T5	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%
IP90-T5	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	10,0%
Controle-T6	46	0,0%	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,2%	0,0%
IP01-T6	19	0,0%	0,0%	0,0%	5,3%	0,0%	63,2%*	5,3%	10,5%
IP38-T6	19	0,0%	0,0%	0,0%	5,3%	10,5%	21,1%*	0,0%	0,0%
IP49-T6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IP49,3-T6	20	5,0%	0,0%	0,0%	20,0%*	100%*	100%*	0,0%	15,0%
IP55-T6	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%	30,0%*	10,0%
IP85-T6	19	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	21,1%*	15,8%	0,0%
IP90-T6	20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%	25%*	0,0%

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$, IP38.2: Amostra diluída 50%; IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.3: Amostras de água diluídas 33%; IP49.4: Amostra diluída 25%; IP55.2: amostra diluída 50%.

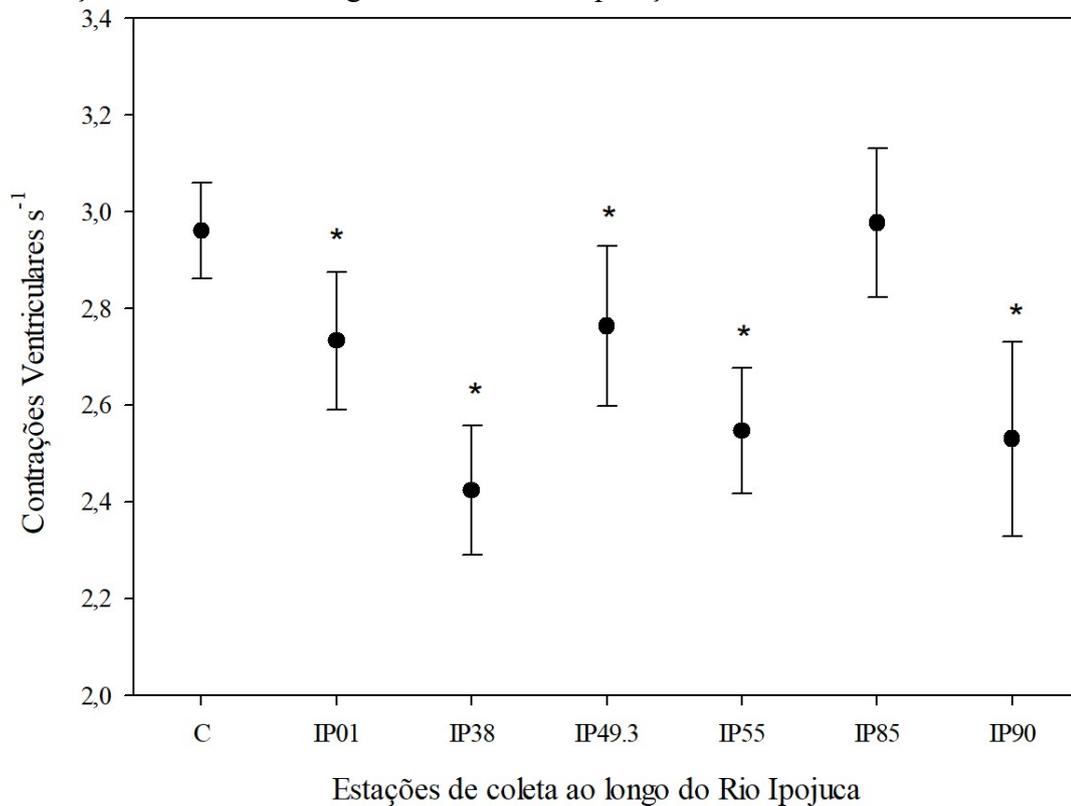
3.5. FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES

A média da frequência de contrações ventriculares cardíacas das larvas no estágio 72 hpf no controle foi igual a $2,76 \pm 0,1$ contrações s^{-1} . Foi verificada uma redução na frequência de contrações em relação ao controle nas larvas expostas à água superficial das estações de coleta IP01, IP38, IP49.3 (diluição 33%), IP55, IP90 em T6 (Figura 4).

Figura 4. Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n = 10) expostas à água superficial das diferentes estações de coleta do Rio Ipojuca em novembro de 2019

(ANOVA, $F = 20,8$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunnett, $p < 0,05$). C: controle, IP49.3: amostras de água diluídas 33%.

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



3.7. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA

As larvas expostas à água superficial da estação IP38 em T1, IP64 em T2, IP38, IP49.4 (diluição 25%) e IP55 em T3, IP38.2 (diluição 50%) e IP49.4 (diluição 25%) em T4, IP38, IP55, IP64, IP65 e IP90 em T5, IP38, IP49.3 (diluição 33%) em T6, desenvolveram velocidade natatória espontânea significativamente reduzida em relação às larvas controle durante os 300s de monitoramento (Figura 5).

Figura 5. Quadro de gráficos da velocidade natatória espontânea média expressa em (cm s^{-1}). Análise realizada com as diferentes estações de coleta do rio Ipojuca nos anos de 2018 e 2019, utilizando larvas 8 dias pós fertilizados.

A: Amostras de T1 (Kruskal–Wallis, $H = 14,38$ $p = 0,013$, Dunn $p < 0,05$);

B: Amostras de T2 (ANOVA, $F = 4,64$, $p \leq 0,001$, 0,94, Dunnett $p < 0,05$);

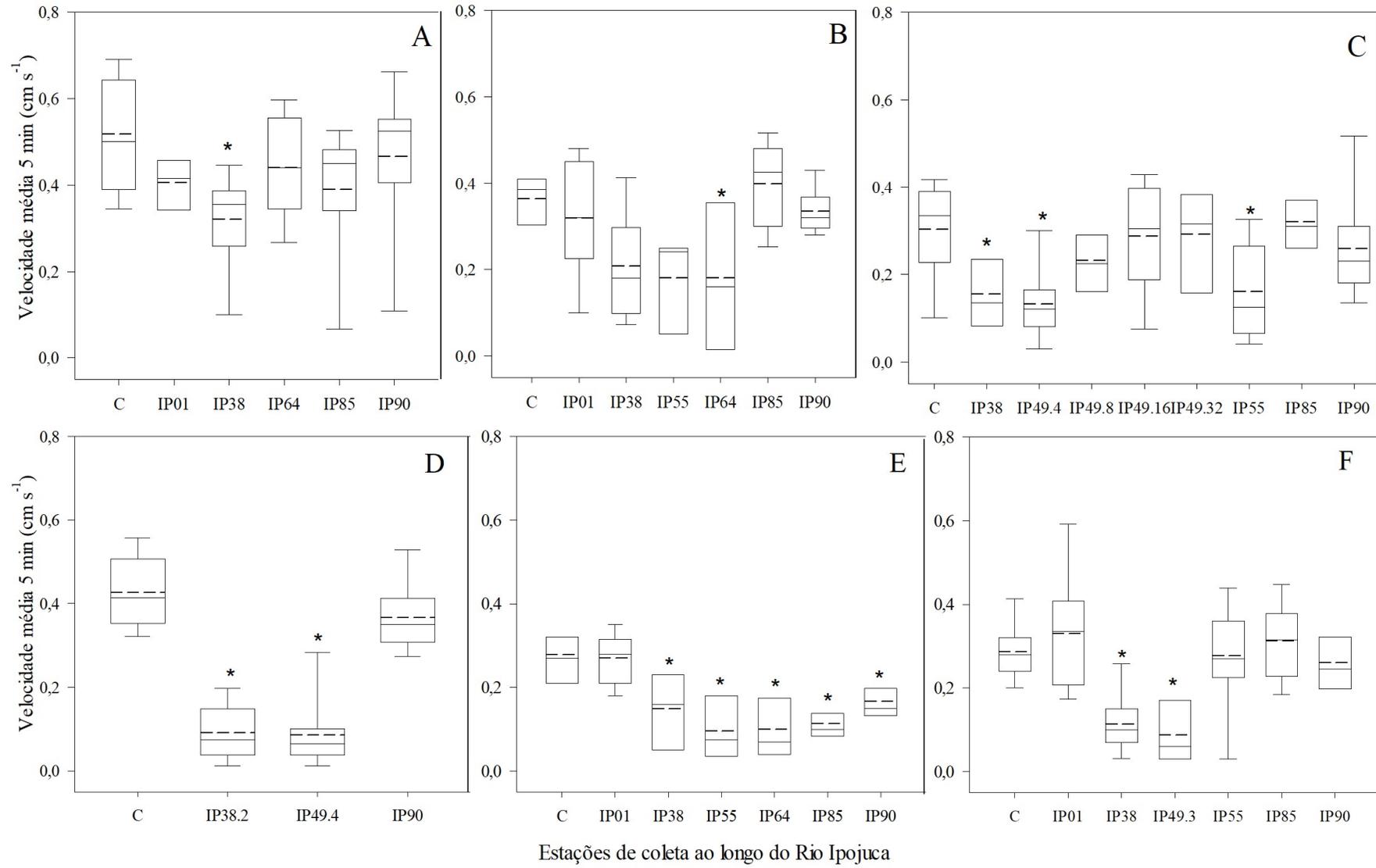
C: Amostras de T3 (ANOVA, $F = 4,18$, $p \leq 0,001$, 0,96, Dunnett $p < 0,05$);

D: Amostras de T4 (Kruskal–Wallis, $H = 27,29$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);

E: Amostras de T5 (ANOVA, $F = 10,4$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

F: Amostras de T6 (ANOVA, $F = 10,13$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$). IP38.2: amostra diluída 50%; IP49.4: amostras de água diluídas 25%; IP49.8: Amostras de água diluídas 12,5%; IP49.16: Amostras de água diluídas 6,25 IP49.32: Amostra diluída 3,13%; IP49.3: Amostra diluída 33%.

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.8. PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S

A análise detalhada do padrão de natação das larvas controle em intervalos de 10s ao longo de todo o período monitorado (30 intervalos de 10s) revelou que as mesmas apresentam um padrão consistente de natação em que permanecem em média 70% do tempo em repouso (velocidade $\leq 0,05 \text{ cm s}^{-1}$), 18% em natação lenta (entre $0,05$ e $0,5 \text{ cm s}^{-1}$), e 13% em natação rápida ($> 0,5 \text{ cm s}^{-1}$). A fração de tempo que as larvas permanecem em repouso aumentou e a fração de tempo que as larvas nadaram rapidamente diminuiu nas larvas expostas à água de IP38, IP55, IP64, IP85 e IP90 (Figura 6 e 7).

Figura 6. Fração do tempo total de 300s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas expostas à água superficial das estações de coleta do Rio Ipojuca se mantiveram em repouso (retângulo preto), em natação lenta (retângulo branco), ou em natação rápida (retângulo cinza).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (ANOVA, seguido de Dunnett $p < 0,05$).

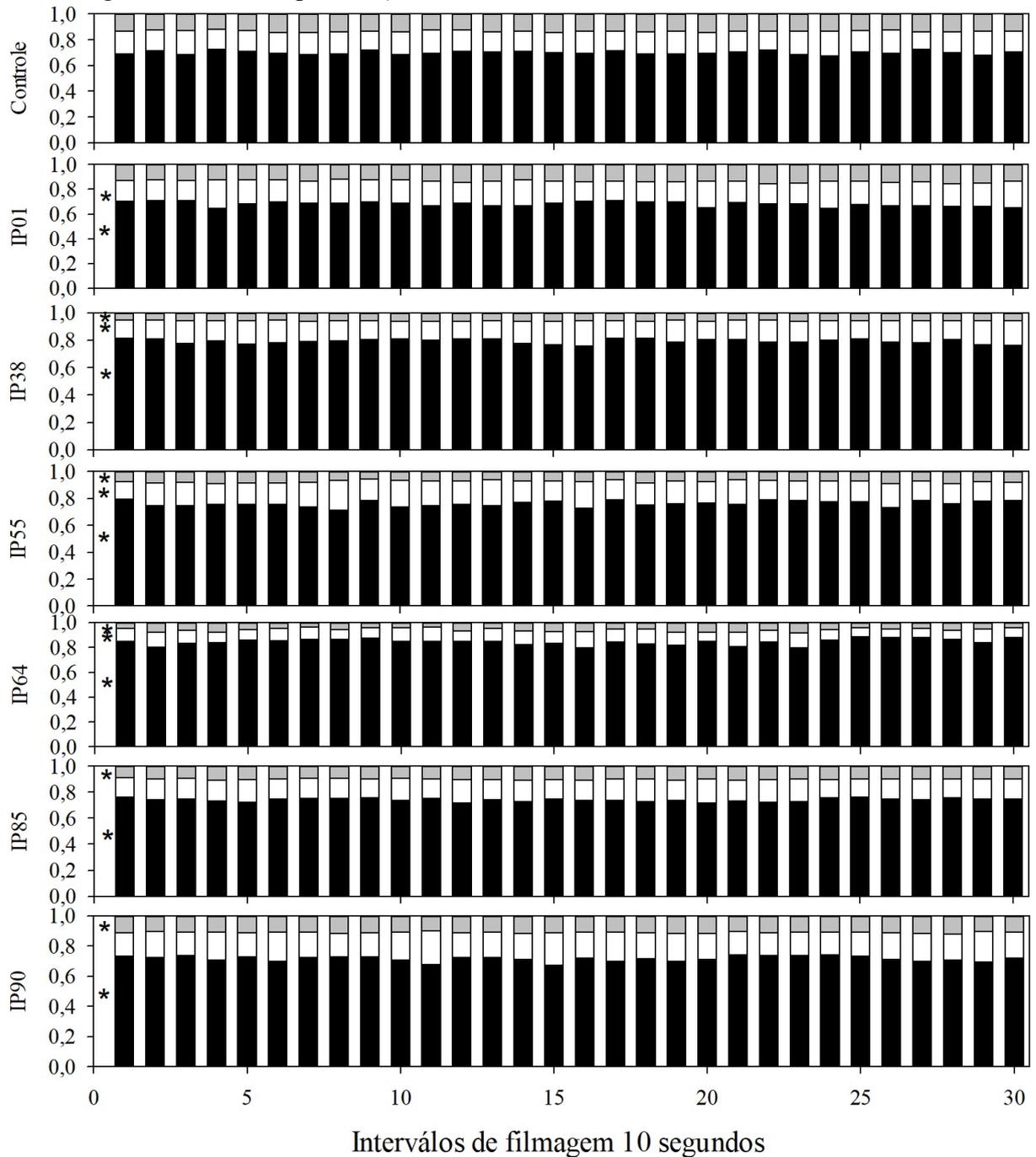


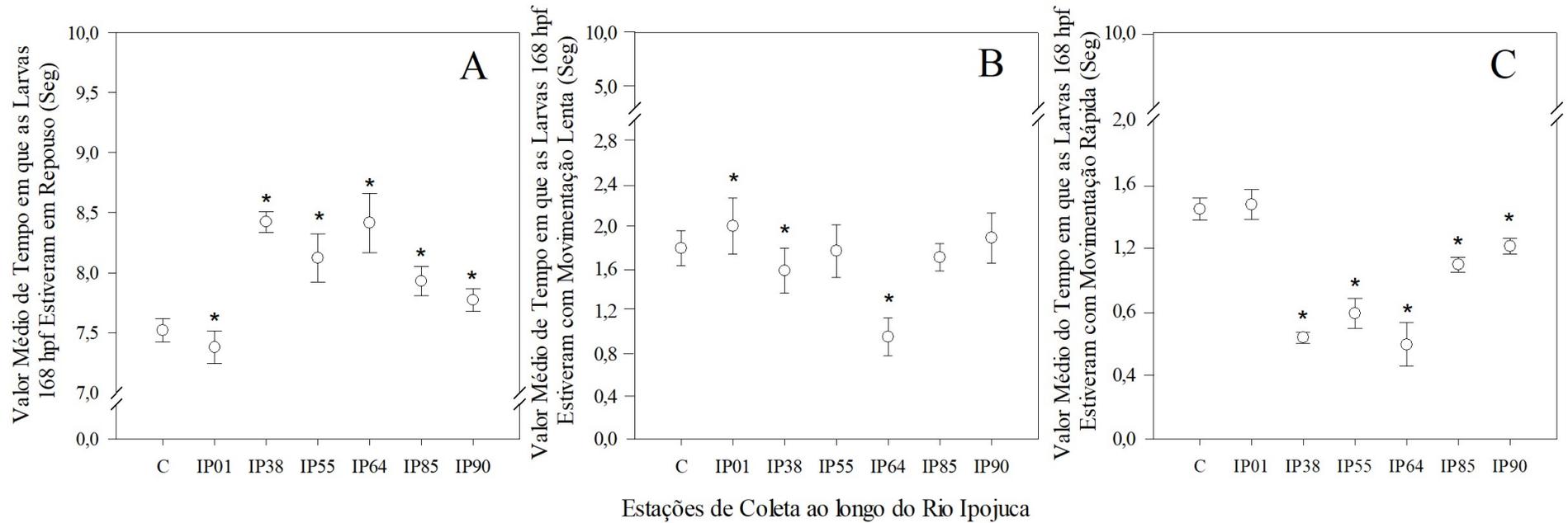
Figura 7. Quadro de gráficos com fração do tempo total de 300s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas expostas à água superficial das estações de coleta do Rio Ipojuca estiveram em

A: Sem movimentação repouso (ANOVA, $F = 220,06$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

B: Tempo em que estiveram em movimentação lenta (ANOVA, $F = 79,73$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$)

C: Tempo em que as larvas estiveram com movimentação rápida (ANOVA, $F = 594,5$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).

(*) Diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.6. COMPRIMENTO TOTAL

O comprimento total das larvas expostas a água superficial Na estação IP55 em T2, IP38 e IP49.3 (diluição 33%) em T6 foi menor que o comprimento dos controles (Figura 8).

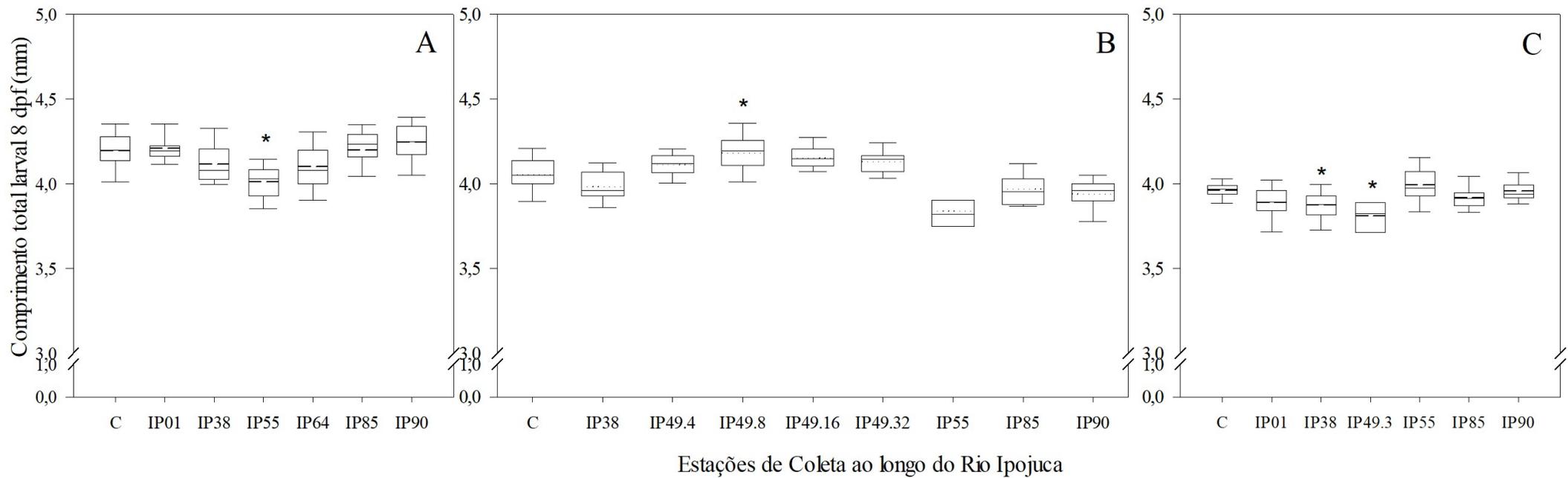
Figura 8. Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias após a fertilização (dpf) expostas a água superficial de estações de coleta do Rio Ipojuca e a água controle (C). Painéis;

A: (Kruskal–Wallis, $H = 34,47$, $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);

B: (ANOVA, $F = 3,105$, $p = 0,018$, Dunnett $p < 0,05$);

C: (ANOVA, $F = 6,104$, $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$): agosto de 2018, novembro de 2018 e novembro de 2019, respectivamente. IP49.3: Amostra diluída 33%; IP49.4: amostra diluída 25%; IP49.8: amostras de água diluídas 12,2%; IP49.16: Amostras de água diluídas 6,25% e IP49.32: Amostras de água diluídas 3,13%.

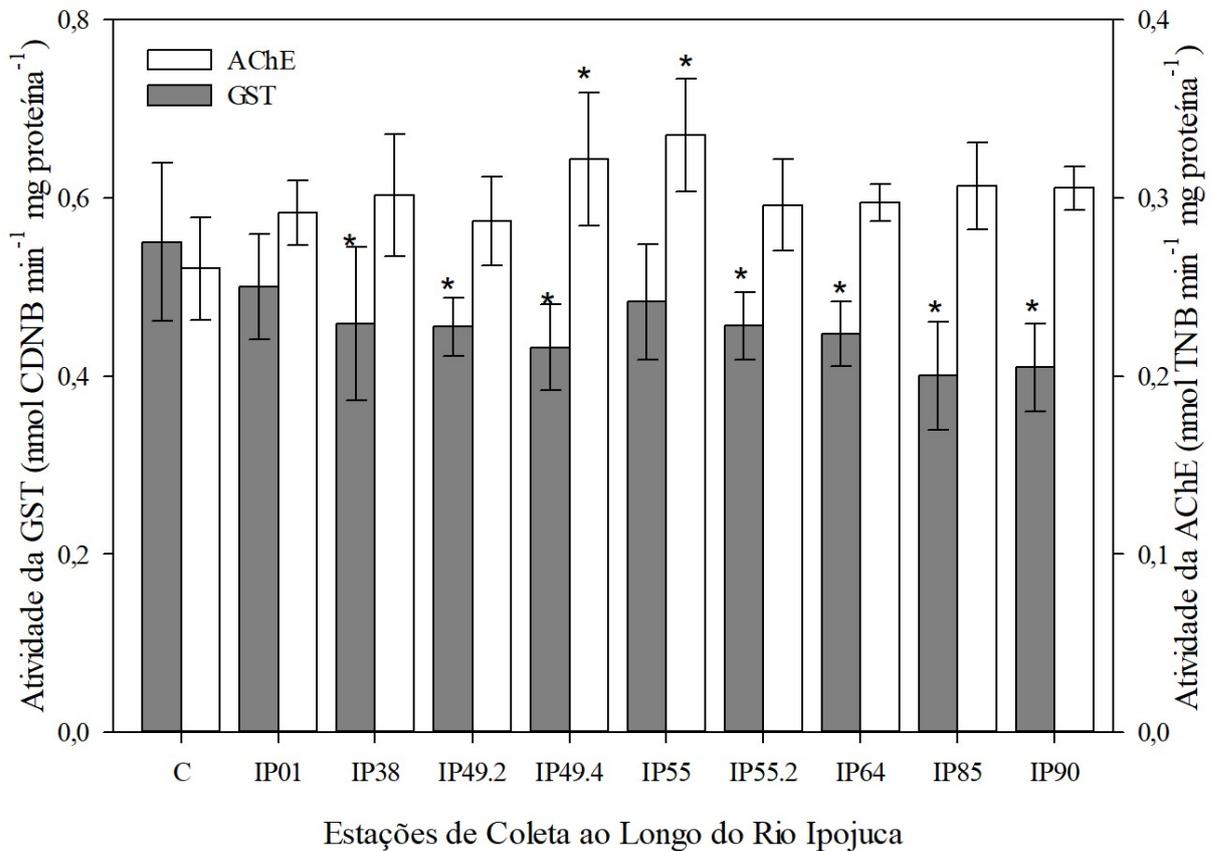
(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (Kruskall Wallis seguido de Dunn, $p < 0,05$).



3.9. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da enzima GST foi analisada para amostras da coleta relativa à Agosto-2019, tendo sido verificada redução significativa relativa ao controle nas larvas expostas a água de todas as estações de coleta exceto IP01 (Figura. 9).

Figura 9. Atividade das enzimas Glutaciona-S-transferase (GST) e ($n = 7,3 \pm 0,8$) Acetilcolinesterase (AChE) ($n = 4 \pm 0$) (ANOVA, $F = 4,11$, $p \leq 0,001$, seguido de Dunnett $p < 0,05$); (ANOVA, $F = 2,35$, $p = 0,038$, Dunnett, $p < 0,05$) em pool de larvas inteiras de *Danio rerio* após 7 dias de exposição às águas superficiais de diferentes estações de coleta ao longo do Rio Ipojuca em agosto de 2019. C: controle, IP49.2: amostras de água diluídas 50%; IP49.4: Amostras de água diluídas 25%; IP55.2: amostras de água diluída 50%. (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.10. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A atividade da enzima AChE foi analisada para amostras da coleta relativa a agosto-2019, tendo sido verificado aumento significativo relativo ao controle nas larvas expostas às águas superficiais da estação IP49 diluída a 25% e da estação IP55 diluída a 50% (Figura. 9).

4. DISCUSSÃO

O rio Ipojuca corta diferentes trechos urbanos e recebe uma carga muito expressiva de efluentes industriais, domésticos e de escoamento urbano, tornando as amostras de água superficiais coletadas prováveis misturas com diferentes graus de complexidade na sua composição por diferentes classes de contaminantes, e cujo risco ecotoxicológico para as espécies aquáticas só pode ser avaliado com eficiência por modelos biológicos com sensibilidade significativa a estas misturas. Este estudo indicou que os locais analisados ao longo do curso do Rio Ipojuca são impactados em diferentes graus com base na ecotoxicidade letal e subletal para os estágios iniciais de desenvolvimento de *Danio rerio*, tendo sido verificado uma elevada toxicidade de suas águas superficiais nas estações IP49, IP38, IP55, uma toxicidade em grau intermediário nas estações IP85 e IP90, e menor toxicidade na estação IP64 e IP01.

A mortalidade é um fator preocupante principalmente nas estações mais críticas do Rio Ipojuca IP38, IP49 e IP55. Larvas expostas a águas dos três pontos em questão apresentaram taxas de mortalidade superiores a 50%. A região em questão constitui uma zona de transição entre a parte intermitente e a parte perene do rio, e em determinados períodos do ano deve haver um aumento na concentração de substâncias que contaminam as águas do rio. O fenômeno se dá pela estase hídrica do rio que por estar imerso em região urbana recebe carga significativa de esgoto doméstico e industrial, que ao invés de seguir o curso se cumula, possibilitando um maior potencial tóxico destas estações (Chiu *et al.*, 2017). Foi verificada uma constante e preocupante taxa de mortalidade de 100% em 5 das 6 coletas realizadas na estação IP49 a jusante da cidade de Caruaru, tanto em períodos secos como em períodos chuvosos. A cidade de Caruaru é um polo industrial e têxtil com significativa urbanização, quando comparada a outras cidades do interior de Pernambuco. Este elevado grau de toxicidade tem sido historicamente diagnosticado desde 2002 com base em testes agudos avaliando a imobilidade de *Daphnia magna* e com testes focados no decréscimo da luminescência em bactérias *Vibrio fischeri* (Soares De Mendonça, 2005a). As águas superficiais do Rio Ipojuca na estação IP49 apresentam elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), altas concentrações de fósforo total e concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de $< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (CPRH, 2020). A impossibilidade de sobrevivência de invertebrados e vertebrados nestes níveis de oxigênio dissolvido é óbvia, e cabe salientar que os efeitos tóxicos letais verificados nos estágios embriolarvais de *D. rerio* não são decorrentes deste fator, uma vez que as amostras de água superficial foram oxigenadas antes da exposição dos peixes, garantindo valores de oxigênio dissolvido próximo de 5 mg L^{-1} . Desta forma cabe

afirmar que muitos dos efeitos subletais e a própria letalidade nestas amostras podem ser decorrentes de outros compostos presentes nesta mistura complexa.

Entre as moléculas químicas potencialmente tóxicas presentes nas águas superficiais do Rio Ipojuca, em especial na estação IP49, as concentrações de amônia na forma tóxica não ionizada NH_3 se destacam, sendo que NH_3 pode causar letalidade e uma diversidade de efeitos subletais a peixes, incluindo perda de equilíbrio, hiperplasia das brânquias e desequilíbrios ionorregulatórios (Fairchild *et al.*, 2005; Usepa, 2013). A amônia não ionizada pode gerar efeitos subletais a partir de concentrações muito pequenas, próximas a $0,022 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Mariz Jr, C.F. capítulo 2 do mestrado). O relatório técnico de 2019 da CPRH a estação IP49 apresentou $1,42 \text{ mg L}^{-1}$ de NH_3 , valor calculado a partir da amônia total, pH, temperatura e pK (CPRH, 2020). No entanto em suas coletas anteriores a estação apresentou valores em água superficiais equivalentes a 0,10; 0,19; 0,27; 0,16 e 0,14 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ nas coletas realizadas em maio, agosto e novembro de 2018, e maio e agosto de 2019, respectivamente (CPRH, 2020), e foram verificadas taxas de mortalidade de 100% de *D. rerio* em todas estas coletas, com exceção de agosto de 2018, com 85% de mortalidade (Tabela 2). A concentração de NH_3 que causa 95% de mortalidade a *D. rerio* após exposição por 96h durante a fase embriolarval desde a fase de ovo fertilizado ($\text{LC}_{95}\text{-NH}_3_{96\text{h}}$) é igual a $2,99 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (limites de confiança fiduciais inferior = 2,82, superior = 3,18) (Mariz Jr, C.F. capítulo 2 do mestrado).

A maior concentração de NH_3 nas águas superficiais da estação IP49 foi igual a $1,42 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ em novembro de 2019, quando foi verificada 100% de mortalidade de *D. rerio* e que representa 47% da $\text{LC}_{95}\text{-NH}_3_{96\text{h}}$ mencionada acima. Além disso, esta concentração é de 5 a 10x superior às concentrações de NH_3 nos outros meses de coleta em IP49. Portanto, em nenhuma das amostras de água superficial da estação IP49 as concentrações de NH_3 verificadas permitem explicar isoladamente a mortalidade de 100% detectada ao longo deste estudo, confirmando que esta elevada mortalidade é também significativamente influenciada por outras moléculas presentes na mistura complexa presente nas águas superficiais da estação IP49. Foi quantificada contaminação pelos metais Níquel e Zinco em sedimentos de fundo classificados como “bed load” na porção final do Rio Ipojuca, alguns deles em concentrações acima dos critérios de qualidade de sedimento associados à alta probabilidade de efeitos tóxicos em organismos bentônicos (Da Silva *et al.*, 2017), e é possível que estes metais estejam contribuindo com a toxicidade verificada.

A GST é uma importante enzima de biotransformação de fase 2 de xenobióticos, contudo a enzima foi inibida em todas as estações de coleta de 08.2019, exceto na estação

IP01, considerado o mais afastado do ambiente urbano. A estação IP80 e IP90 são os pontos mais próximos da foz e os que apresentaram uma maior taxa de inibição chegando respectivamente a 28% e 26%, comparados ao controle. Inibições da atividade da GST em larvas de *Danio rerio* já foram associadas à exposição aos antibióticos do grupo das tetraciclina (Yu *et al.*, 2019) que são encontrados em corpos hídricos que recebem efluentes domésticos (Li *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2020). As amostras desse período foram coletadas na estação chuvosa (Tabela. 1), em que há uma maior probabilidade de carreamento de contaminantes provenientes do esgoto doméstico. A GST é uma importante enzima de desintoxicação de xenobióticos (Sies, 1999), uma vez inibida o organismo pode estar mais susceptível aos efeitos de diferentes poluentes como os HPA e os metais (Shailaja e D'silva, 2003; Long *et al.*, 2011).

A AChE é uma importante biomarcador de neurotoxicidade e a indução desta enzima pode ser causada por diferentes poluentes ambientais como alguns fenoxifenóis presentes no esgoto doméstico (Gomes *et al.*, 2021) e por contaminação por herbicidas (Samanta *et al.*, 2014). Os animais expostos as amostra da estação IP49 diluída 25% e IP55 coletadas em agosto de 2019, período chuvoso, apresentaram aumento estatístico na AChE, alcançando uma atividade 23% e 29% maiores, respectivamente, quando comparados ao controle. A indução na atividade da AChE na fenda sináptica pode reduzir o tempo de contato do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no receptor colinérgico e ou muscarínico. A AChE está diretamente relacionada com a despolarização das células nervosas pelos receptores nicotínicos e muscarínicos, e alterações na passagem deste neurotransmissor pode gerar complicações comportamentais e cognitivas para o organismo (Picciotto *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2014). Este aumento da atividade da AChE pode estar relacionado a algumas das alterações comportamentais encontradas neste trabalho.

O desenvolvimento embrionário envolve uma etapa fundamental na vida do organismo durante a qual toda estrutura do corpo é formada. Desta forma qualquer fator ambiental que venha a interferir na organogênese pode gerar complicações que acompanharão o indivíduo até etapas mais avançadas de seu ciclo de vida, podendo inclusive leva-lo a uma perda da sua capacidade adaptativa e a morte precoce. O índice de qualidade de águas (IQA) é uma ferramenta bastante útil, principalmente quando utilizado em conjunto com testes ecotoxicológicos (Oberdorff e Hughes, 1992), e indicam alterações na qualidade de águas superficiais causadas pelas atividades antrópicas, em especial o esgoto doméstico e escoamento de compostos agroindustriais, que correspondem juntos a 94% da carga poluidora orgânica no rio Ipojuca (CPRH, 2020).

O índice de desenvolvimento morfológico das larvas expostas às amostras de água superficial foi afetado em algum momento em quase todos os pontos de coleta, sendo que apenas as larvas expostas a águas da estação IP64 não apresentaram diferença estatística (Figura 2 e 3) relativa aos controles. As particularidades que colocam o IP64 em uma condição melhor que as demais estações de coleta em relação a algumas alterações são principalmente seu afastamento da área urbana e presença de mata ciliar a montante do ponto de coleta, apesar da presença de plantações em alguns pontos próximos. A mata ciliar retém substâncias que podem ser carregadas para o curso do rio e podem assegurar a manutenção da qualidade das águas (Barrella e Petre, 2003). As principais alterações encontradas em embriões e larvas durante o período de experimentação e que consequentemente afetaram na redução do índice GMS nas amostras testadas foram o desenvolvimento normal da boca, a ausência de absorção de saco vitelínico, a ausência de bexiga natatória e a ausência de circulação (Tabela 3A, B). A ausência de circulação gera problemas em cadeia durante a organogênese, desta forma esta ausência pode impedir a absorção do vitelo que por sua vez é a principal fonte de energia durante a fase embrionária destes teleósteos (Kamler, 2007; Hilton *et al.*, 2008). A pouca energia absorvida pode estar influenciando no desenvolvimento dos embriões, cuja demanda é significativa para o desenvolvimento dos órgãos. Em contrapartida a ausência de circulação responsável pelo carreamento da energia, representada pelo vitelo, e o redirecionamento da mesma para processos de biotransformação pode prejudicar o desenvolvimento adequado do embrião.

Algumas outras patologias encontradas no *Danio rerio* durante as 96h de experimentação deste trabalho foram os edemas, hemorragias e eclosão precoce. É importante avaliar que as larvas expostas às estações IP49 e IP55 que mais obtiveram altas frequências destas patologias estão associadas a locais muito urbanizados e que sabidamente possuem baixo índice de qualidade de águas classificados como péssima e aceitável, além dos altos níveis de eutrofização, classificados constantemente como hipereutrófico (Tabela 4 anexo1). A eclosão precoce de larvas de *Taki-fugu rubripes* tem sido associada à contaminação por petróleo (Kawaguchi *et al.*, 2012) e antin crustantes presentes em tintas de barcos também induzem esse efeito em larvas de *Danio rerio* (Liang *et al.*, 2017). Edemas e hemorragias são comumente encontradas em estágios embriolarvais de *Danio rerio* após a exposição a hidrocarbonetos de petróleo (Incardona *et al.*, 2004) e a cobre e cádmio (Jeziarska *et al.*, 2009).

As alterações na frequência cardíaca encontradas neste trabalho podem estar associadas a diferentes classes de contaminantes, já sendo conhecida a ação dos

hidrocarbonetos de petróleo e organoclorados sobre os mecanismos de desenvolvimento do coração na fase embrionária (Incardona e Scholz, 2017). Além disso, o coração e seu funcionamento são parâmetros bastante sensíveis a xenobióticos em diferentes fases do ciclo da vida, tendo sido descritas reduções na frequência cardíaca no *D. rerio* 11 dpf exposto a 2 mg L⁻¹ de níquel (Nabinger *et al.*, 2018), rejeitos da exploração de carvão (Yang *et al.*, 2019) e misturas ambientais (Moon *et al.*, 2020).

Os problemas no desenvolvimento embriolarval apresentados no GMS (Figura 2 e 3) e diferentes situações patológicas como ausência de absorção do vitelo e eclosão prematura (Tabela 3 A, B), são fatores que poderiam gerar algum dano no crescimento devido às diversas estruturas anatômicas comprometidas. As estações IP38 e IP55 são os únicos pontos que apresentam redução estatística no crescimento larval. Os pontos IP38 e IP55 são localizados em zonas onde a atividade predominante é a pecuária de corte, além de serem encontrados altos níveis de fosforo e coliformes e eutrofização em 2018 (Tabela 4 anexo 1) (CPRH, 2020). Os três pontos já mencionados são historicamente os que possuem altos níveis de DBO, fosforo total, coliformes, eutrofização e em alguns momentos o IP38 apresenta valores de pH próximos de 8 (Hídricos, 2010). O pH alcalino é perigoso em ambientes que possuem amônia alta devido a formação de amônia não ionizada que segundo (Randall e Tsui, 2002) é tóxica para peixes. Além disso, a amônia deixa os peixes imunodebilitados, sendo perigosa a exposição nesses ambientes que recebem uma carga muito alta de esgoto doméstico (Gonçalves *et al.*, 2017).

Após o período de exposição às larvas apresentaram diferentes distúrbios nos padrões natatórios e na velocidade média. As larvas expostas à todas as estações de coleta, exceto as do IP01, apresentaram reduções estatísticas na velocidade média (Figura 5). As reduções na velocidade natatória de organismos aquáticos implicam em possíveis consequências para a captura de presa no ambiente, além de fatores como movimentos evasivos em situações de fuga. As estações IP38, IP49 e IP55 quando presentes exerceram maior efeito no parâmetro velocidade natatória sobre as larvas expostas, coincidentemente as áreas de coleta são caracterizadas como as mais poluídas, sendo constatado IQAs de péssimo a ruins nas estações IP49 e IP55. Os parâmetros comportamentais se mostraram mais sensíveis que o GMS para a estação IP64 que não havia apresentado diferença estatística para o mesmo parâmetro. É importante ressaltar que o rio Ipojuca possui regime intermitente até Caruaru e no mês da coleta (T5) em que as águas superficiais do IP64, além das estações IP38, IP55, IP85 e IP90, mais exerceram dano comportamental as larvas foi caracterizado como um período chuvoso

(Tabela 1) o que pode ter carregado uma carga de poluentes dos pontos anteriores IP49 e IP55 que sabidamente são os que geraram efeitos mais severos para as larvas expostas.

As proporções nos diferentes padrões de velocidade também foram expressivamente alteradas de modo geral as larvas do IP01 estiveram mais tempo nadando (Figura 7A), enquanto as dos demais tratamentos IP38, IP55, IP64, IP85 e IP90 estiveram mais tempo em repouso. O mesmo padrão se repetiu para decréscimo com natação rápida, exceto IP01 e redução de movimentação lenta no IP38 e IP64 (Figura 6 e 7). Reduções nos padrões de velocidade e até da velocidade média podem reduzir o sucesso da detecção e captura de presa, comportamento que exige do animal impulsos de velocidade (Eve Robinson *et al.*, 2019). Os organismos que passam a maior parte do tempo em repouso certamente podem estar com algum problema e amostras ambientais, em especial de zonas onde há cultura de vegetais, é comum encontrar e presença de pesticidas e herbicidas que sabidamente atuam na atividade das colinesterases que podem alterar o comportamento natatório (Fulton *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013).

A velocidade natatória e a velocidade máxima reduzida já foram associadas à exposição à organofosforados com $3 \mu\text{g L}^{-1}$ no peixe *Fundulus parvipinnis* (Renick *et al.*, 2016). O rio Ipojuca já foi avaliado para pesticidas organoclorados, onde os resultados se mostraram alarmantes na região conhecida como IP38 e IP49 no período seco (Araujo *et al.*, 1998). Os contaminantes organoclorados são tóxicos para o *Danio rerio* adulto e gera problemas no desempenho natatório (Pereira *et al.*, 2012). Outros fatores que podem estar envolvidos na natação normal destes organismos são a ausência de insuflamento da bexiga natatória, ausência de nadadeiras peitorais e não absorção do saco vitelínico que garante a energia necessária para o forrageio nos primeiros momentos da vida. A bexiga natatória é um órgão decisivo para a natação normal de peixes e foi visto que as larvas expostas as estações como IP49, IP49.3 (FD.3) em T5 e T6, além das larvas expostas a estação IP01 em T1 (Tabela 3B) apresentaram 100% de ausência do insuflamento deste órgão. O órgão em questão é responsável pela flutuação neutra do organismo, garantindo um melhor desempenho natatório de fuga e captura de presa pela redução de atrito com o meio, podendo sua ausência resultar em baixo crescimento e maior mortalidade nesse período (Czesny *et al.*, 2005; Woolley e Qin, 2010).

CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados foi possível identificar com base nos diferentes parâmetros morfológicos e comportamentais que as estações consideradas levemente tóxicas

foram IP01 e IP64, moderadamente tóxica como sendo o IP85 e IP90 e as estações muito tóxicas como sendo IP38, IP49 e IP55. O fator amônia tóxica encontrada em excesso nas estações IP55 e principalmente IP49 não foram os principais fatores envolvidos nas altas taxas de mortalidade encontradas, sendo apontado que o fator urbanização pode ser o principal causador dos danos encontrados. Além disso, o *Danio rerio* se mostrou um excelente bioindicador para a avaliação da toxicidade de águas superficiais, levantando diferentes níveis de resposta aos possíveis contaminantes presente nestas misturas.

REFERÊNCIAS

APAC. **Síntese Climática (Dezembro de 2018)**. Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC). <http://www.apac.pe.gov.br/>, p.33. 2019

_____. **Síntese Climática (Dezembro de 2019)**. Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC). <http://www.apac.pe.gov.br/>, p.34. 2020

ARAÚJO, A. C. P. et al. Organochlorine Pesticide Contamination in the Ipojuca Basin, Brazil. **Environmental Technology**, v. 19, n. 1, p. 109-113, 1998/01/01 1998. ISSN 0959-3330.

BALLESTEROS, C. I. et al. Effect of Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions on Contextual Fear Conditioning and Unconditioned Defensive Behavior Induced by Electrical Stimulation of the Dorsal Periaqueductal Gray. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83342, 2014.

BARRELLA, W.; PETRERE, M. Fish community alterations due to pollution and damming in Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **River Research and Applications**, v. 19, n. 1, p. 59-76, 2003. ISSN 1535-1467.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976. ISSN 0003-2697.

CHIU, M.-C. et al. Chapter 5.1 - Anthropogenic Threats to Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. In: DATRY, T.;BONADA, N., et al (Ed.). **Intermittent Rivers and Ephemeral Streams**: Academic Press, 2017. p.433-454. ISBN 978-0-12-803835-2.

CHRISTOPHE, M.; RACHID, A.; MARIO, L. Chapter 13 - Fish as Reference Species in Different Water Masses. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C., *et al* (Ed.). **Aquatic Ecotoxicology**: Academic Press, 2015. p.309-331. ISBN 978-0-12-800949-9.

CPRH. **RELATÓRIO DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**. Recife: 2014. 104.

_____. **3.5 Ipojuca**. Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH) www.CPRH.pe.gov.br, p.13. 2020

CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D. S.; DETTMERS, J. M. Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 134, n. 4, p. 1011-1020, 2005.

DA SILVA, Y. J. A. B. et al. Bedload as an indicator of heavy metal contamination in a Brazilian anthropized watershed. **CATENA**, v. 153, p. 106-113, 2017/06/01/ 2017. ISSN 0341-8162.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961 1961. ISSN 0006-2952.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010. ISSN 0166-445X.

EVE ROBINSON, H. et al. Predation strategies of larval clownfish capturing evasive copepod prey. **Marine Ecology Progress Series**, v. 614, p. 125-146, 2019.

FAIRCHILD, J. F. et al. Chronic Toxicity of Un-ionized Ammonia to Early Life-Stages of Endangered Colorado Pikeminnow (*Ptychocheilus lucius*) and Razorback Sucker (*Xyrauchen texanus*) Compared to the Surrogate Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 378-384, 2005/10/01 2005. ISSN 1432-0703.

FULTON, M. H.; KEY, P. B.; DELORENZO, M. E. Insecticide Toxicity in Fish. v. 33, p. 309-368, 2013. ISSN 15465098.

GIKAS, G. D. et al. Comparative evaluation of river chemical status based on WFD methodology and CCME water quality index. **Science of The Total Environment**, p. 140849, 2020/07/15/ 2020. ISSN 0048-9697.

GOMES, M. F. et al. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

GONÇALVES, A. F. et al. Cortisol plays a role in the high environmental ammonia associated suppression of the immune response in zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 249, p. 32-39, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0016-6480.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HÍDRICOS, S. D. R. **Plano Hidroambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Ipojuca. TOMO 1 - Diagnóstico Hidroambiental**. SRH. Recife: Secretaria de Recursos Hídricos do Estado de Pernambuco. 2: 189 p. 2010.

HILTON, Z.; POORTENAAR, C. W.; SEWELL, M. A. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). **Marine Biology**, v. 154, n. 5, p. 855-865, 2008/06/01 2008. ISSN 1432-1793.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 196, n. 2, p. 191-205, Apr 15 2004. ISSN 0041-008X (Print)0041-008X (Linking).

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. Environmental Pollution and the Fish Heart. v. 36, p. 373-433, 2017. ISSN 15465098.

JEZIERSKA, B.; ŁUGOWSKA, K.; WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009/11/01 2009. ISSN 1573-5168.

KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, n. 2, p. 143, 2007/08/18 2007. ISSN 1573-5184.

KAWAGUCHI, M. et al. Nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early hatched pufferfish larvae exposed to heavy oil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2488-2497, 2012/08/01 2012. ISSN 1614-7499.

LI, D. et al. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 80-86, 2008/01/01 2008. ISSN 0730-7268.

LIANG, X. et al. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. **Chemosphere**, v. 189, p. 498-506, 2017.

LONG, Y. et al. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 310-317, 2011/04/01/ 2011. ISSN 1532-0456.

LÓPEZ-DOVAL, J. C. et al. Pollution in mediterranean-climate rivers. **Hydrobiologia**, v. 719, n. 1, p. 427-450, 2013/11/01 2013. ISSN 1573-5117. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1369-5> >.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol**, v. 196, p. 132-145, Mar 2018. ISSN 1879-1514 (Electronic)0166-445X (Linking).

MOON, W. K.; ATIQUE, U.; AN, K. G. "Ecological risk assessments and eco-toxicity analyses using chemical, biological, physiological responses, DNA damages and gene-level biomarkers in Zebrafish (*Danio rerio*) in an urban stream". **Chemosphere**, v. 239, p. 124754, Jan 2020. ISSN 1879-1298 (Electronic)0045-6535 (Linking).

MÜLLER, U. K.; VAN LEEUWEN, J. L. Swimming of larval zebrafish: ontogeny of body waves and implications for locomotory development. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 5, p. 853, 2004.

NABINGER, D. D. et al. Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 624, p. 1623-1633, 2018/05/15/ 2018. ISSN 0048-9697.

OBERDORFF, T.; HUGHES, R. M. Modification of an index of biotic integrity based on fish assemblages to characterize rivers of the Seine Basin, France. **Hydrobiologia**, v. 228, n. 2, p. 117-130, 1992.

OECD. **Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test**. 2012. Disponível em: < <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264185203-en> >.

_____. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

PEREIRA, V. M. et al. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 469-475, 2012. ISSN 0161-813X.

PÉREZ, J. et al. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 7, p. 4671-4680, 2013/07/01 2013. ISSN 1614-7499.

PICCIOTTO, MARINA R.; HIGLEY, MICHAEL J.; MINEUR, YANN S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012/10/04/ 2012. ISSN 0896-6273.

PNMA. **Monitoramento da Qualidade da Água como Instrumento de Controle Ambiental e Gestão de Recursos Hídricos no Estado de Pernambuco**. CPRH. <http://www.CPRH.pe.gov.br/>, p.28. 2003

R. VAN DER OOST, C. P.-V., AND N.W. VAN DEN BRINK. Chapter three: Biomarkers in environmental assessment. In: P. J. DEN BESTEN, M. M. (Ed.). **Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends and Strategies**. Teylor e Francis Group: Teylor e Francis Group, 2016. cap. 3,

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1–12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.

RENICK, V. C. et al. Effects of a pesticide and a parasite on neurological, endocrine, and behavioral responses of an estuarine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 335-343, 2016.

REYHANIAN, N. et al. 17 α -Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 1–2, p. 41-48, 2011. ISSN 0166-445X.

SAMANTA, P. et al. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 107, p. 120-5, Sep 2014. ISSN 1090-2414 (Electronic)0147-6513 (Linking).

SECTA/PNMA. **Levantamento das Fontes Poluidoras na Bacia do Rio Ipojuca** SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. M. A. D. P. Recife - PE: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco: 54 p. 2003.

SHAILAJA, M. S.; D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. **Chemosphere**, v. 53, n. 8, p. 835-841, 2003.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 916-921, 1999/11/01/ 1999. ISSN 0891-5849.

SOARES DE MENDONÇA, V. **Aplicabilidade de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, no monitoramento da qualidade das águas de bacias hidrográficas: o caso do rio Ipojuca em Pernambuco.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife., 2005.

USEPA. **Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Ammonia Freshwater - EPA 822-R-13-001.** Washington DC: USEPA, 2013. 255.

VAN DER OOST, R. et al. Identifying adverse outcome pathways (AOP) for Amsterdam city fish by integrated field monitoring. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 74, p. 103301, 2020/02// 2020. ISSN 1382-6689.

WANHONG, L. et al. Industrial water pollution and transboundary eco-compensation: analyzing the case of Songhua River Basin, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, 10/01 2020.

WOOLLEY, L. D.; QIN, J. G. Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. **Reviews in Aquaculture**, v. 2, n. 4, p. 181-190, 2010.

YANG, C.; SONG, G.; LIM, W. A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 237, p. 108840, 2020/11/01/ 2020. ISSN 1532-0456.

YANG, F.; LI, G.; SANG, N. Embryonic exposure to soil samples from a gangue stacking area induces thyroid hormone disruption in zebrafish. **Chemosphere**, v. 236, p. 124337, Dec 2019. ISSN 1879-1298 (Electronic)0045-6535 (Linking).

YU, X. et al. Tetracycline antibiotics as PI3K inhibitors in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative stress in zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 226, p. 696-703, 2019.

III MANUSCRITO II

Toxicidade letal e subletal de amônia não ionizada para o desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio* com base em biomarcadores bioquímicos, morfológicos e comportamentais.

RESUMO

A amônia não ionizada NH_3 é um contaminante tóxico para organismos aquáticos que pode atingir concentrações significativas em rios sujeitos a contaminação por descargas de matéria orgânica e esgotos domésticos como o Rio Ipojuca. NH_3 está presente frequentemente em associação com uma diversidade de contaminantes inorgânicos e orgânicos que compõe estas misturas complexas com diferentes níveis de potencial tóxico. O uso de *Danio rerio* no monitoramento da ecotoxicidade de águas superficiais tem aumentado, e é necessário que se tenha informações ecotoxicológicas para a espécie após exposição a NH_3 isoladamente, para que se possa inferir seu potencial tóxico em misturas ambientais complexas. Desta forma, o objetivo deste trabalho é estabelecer a sensibilidade das fases iniciais de desenvolvimento de *D. rerio* a NH_3 baseada em parâmetros de efeitos tóxicos letais e subletais. Foram realizados experimentos de exposição de *D. rerio* a partir da fertilização dos ovos por 96 h a concentrações de NH_3 variando de 0,022 a 5,23 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Foram avaliados efeitos no desenvolvimento embriolarval, frequência de anormalidades, além de efeitos bioquímicos, comportamentais e morfométricos. A concentração letal a 50% das larvas expostas por 96 h ($\text{CL}_{50_{96h}}$) foi igual a 1,96 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, indicando sensibilidade próxima da tipicamente encontrada para outros peixes de água doce. Em termos de efeitos subletais, patologias significativas verificadas incluíram um aumento dose dependente da frequência de embriões em 24 hpf com falhas na circulação sanguínea a partir de 0,15 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, associada a uma diminuição dose dependente da frequência de contrações ventriculares a partir de 0,06 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, aumento dose dependente de atraso no desenvolvimento embriolarval com base no índice “GMS” a partir de 0,15 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, e uma diminuição dose dependente do comprimento total das larvas a partir de 0,61 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Outras anormalidades do desenvolvimento com aumento parcialmente dose dependente foram as frequências de larvas com eclosão prematura em 48 hpf a partir de 0,02 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, e falha na absorção do vitelo e no insuflamento da bexiga natatória em 96 hpf partir de 0,85 e 0,06 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente. A atividade da acetilcolinesterase foi reduzida em 24, 34 e 37 % relativa ao

controle nas larvas expostas a 0,61, 1,34 e 2,53 mg NH₃ L⁻¹, respectivamente. O comportamento natatório das larvas foi alterado, sendo verificada hiperatividade em concentrações intermediárias e hipoatividade nas maiores concentrações associada a tigmotaxia, caracterizada pela natação com maior frequência nas bordas das arenas experimentais. Os resultados deste trabalho contribuem para uma melhor caracterização dos efeitos tóxicos letais e subletais de NH₃ na fase embriolarval de *D. rerio*.

Palavras chave: mortalidade, atraso no desenvolvimento, circulação sanguínea, comportamento natatório, cardiotoxicidade, estresse oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

A amônia é um dos principais contaminantes presentes em ecossistemas aquáticos, e sua espécie não ionizada (NH₃) é ecotoxicologicamente relevante, apesar da disponibilidade de tecnologias para sua remoção de efluentes (Fairchild et al., 2005). NH₃ é gerada a partir da decomposição de proteínas, estando fortemente ligada a decomposição de matéria orgânica. Altos níveis de amônia ambiental (*High Environmental Ammonia*) (HEA) são encontrados em regiões onde tipicamente existe escoamento de insumos domésticos, descarte de efluentes agroindustriais e lixiviação de fertilizantes de base nitrogenada próximo a corpos hídricos (Ip et al., 2004; Fairchild et al., 2005).

A forma mais simples de avaliação do nitrogênio amoniacal no ambiente é através de testes que quantificam a concentração de amônia total, sendo na maioria dos casos negligenciado o potencial tóxico da amônia NH₃. O nitrogênio amoniacal é encontrado na natureza como NH₄⁺ ou NH₃, e a concentração de ambas as espécies é fortemente influenciada pelo pH e pela temperatura (Randall and Tsui, 2002). O NH₃ apresenta potência tóxica significativa para peixes, em especial em locais mais alcalinos. Peixes recém-nascidos são amoniotélicos, dependendo diretamente do meio para realizar a excreção destes metabólitos por diferença de potencial osmótico (Zimmer et al., 2017). O processo de excreção de amônia por difusão evita a perda energética, gerando vantagem para estes organismos que ao contrário dos tetrápodes precisam investir energia no processo de transformação em compostos como uréia ou ácido úrico para facilitar o processo de excreção (Banerjee et al., 2019). Por outro lado, organismos expostos a altas concentrações de amônia na água tendem a reter o metabólito por dificuldade de excretar por difusão, e tendem a mudar a forma de excreção da amônia, que pode seguir rotas que demandam um gasto energético maior. As consequências da retenção da amônia estão em sua maioria ligadas a neurotoxicidade (Randall and Tsui, 2002), redução das defesas imunológicas dos organismos (Gonçalves et al., 2017), alterações no sistema neuroendócrino

nos estágios iniciais de vida (Williams et al., 2017), redução de transporte de oxigênio, redução da atividade alimentar e menor fecundidade (Camargo and Alonso, 2006).

O peixe teleósteo de água doce *Danio rerio* é hoje um dos principais modelos biológicos de vertebrados, sendo utilizado para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento e avaliação de parâmetros ecotoxicológicos em laboratório a nível letal e subletal, incluindo biomarcadores morfológicos e comportamentais (Embry et al., 2010). O uso de *D. rerio* no monitoramento da ecotoxicidade de águas superficiais (VanLandeghem et al., 2012; Botelho et al., 2013) e de sedimentos (Schweizer et al., 2018) em ecossistemas aquáticos tem crescido. Ao mesmo tempo, a concentração de amônia não ionizada NH_3 pode atingir níveis significativos em rios, especialmente aqueles sujeitos à contaminação significativa por descargas de matéria orgânica e esgotos domésticos, estando presente frequentemente em associação com uma diversidade de contaminantes inorgânicos e orgânicos que compõe estas misturas complexas com diferentes níveis de potencial tóxico.

A concentração de NH_3 que resulta em 20% de redução no crescimento ou que causa mortalidade de 20% em peixes varia de 0,07 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$ na espécie mais sensível bluegill *Lepomis macrochirus* a 0,48 mg $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$ no bagre *Ictalurus punctatus* (Fairchild et al., 2005). Entretanto, não existem informações disponíveis sobre a sensibilidade das fases iniciais de desenvolvimento de *D. rerio* a exposição a NH_3 , tanto em termos de toxicidade letal quanto subletal. Estas informações são fundamentais para que se possa inclusive discernir qual a contribuição da amônia não ionizada na toxicidade de misturas ambientais complexas de múltiplos contaminantes que incluam NH_3 na sua composição. Desta forma, o objetivo deste trabalho é estabelecer a sensibilidade das fases iniciais de desenvolvimento de *D. rerio* a NH_3 em termos de efeitos tóxicos letais através do estabelecimento de um modelo concentração resposta. Além disso, também será caracterizada a toxicidade subletal baseada em efeitos no desenvolvimento embriolarval, em biomarcadores morfológicos, bioquímicos e comportamentais entre o estágio de embrião logo após a fertilização até sete dias após a fertilização.

2. METODOLOGIA

2.1. CULTIVO DE *Danio rerio*

Peixes adultos cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) da espécie *Danio rerio* linhagem selvagem de cauda normal foram mantidos em aquários de 100 L, e os padrões de qualidade da água de cultivo mantiveram-se constantes, com a

concentração de amônia total abaixo $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, pH entre 6,6 e 7,4, e oxigênio dissolvido entre $6,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$, temperatura $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A alimentação diária dos adultos reprodutores é realizada com ração 40% de proteína de peixe e náuplios recém-eclodidos vivos de *Artemia salina*. Para a obtenção dos ovos fertilizados, 3 fêmeas maduras e 6 machos foram transferidos para um aquário de desova (15 L) na tarde do dia anterior ao início do experimento. Após a desova e fertilização ao amanhecer, foi realizada uma triagem e seleção de ovos fertilizados e viáveis por observação direta em um estereomicroscópio Zeiss® com 50X de magnificação. A taxa de fertilização foi superior a 90% e os ovos foram utilizados com até 4 horas pós-fertilização (hpf). O sistema de exposição seguiu as normas da OECD 236 (OECD, 2013).

2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EXPOSIÇÃO DURANTE A FASE EMBRIOLARVAL

Foi preparada uma solução estoque de cloreto de amônio (NH_4Cl) 99,5% de pureza (Vetec®) em água ultra pura, com concentração de $400.000 \mu\text{g L}^{-1}$. A solução estoque foi diluída apropriadamente em água de cultivo com pH $8,41 \pm 0,02$ (média \pm desvio padrão), oxigênio $7 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, temperatura $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e alcalinidade medida em carbonatos totais $\text{CaCO}_3 = 97 \text{ mg L}^{-1}$, a fim de obter as concentrações nominais desejadas. As soluções foram mantidas em garrafas âmbar e armazenadas a 4°C até o início das exposições.

A concentração real de amônia total na água foi quantificada pelo método colorimétrico do indofenol (Koroleff, 1976) em um espectrofluorímetro (SpectraMax M3, EUA) usando o comprimento de onda 673 nm para absorbância. A estimativa das concentrações foi realizada através de uma curva analítica com oito concentrações de 0 a 6 mg amônia total L^{-1} ($R^2 = 0,996$), segundo a equação:

$$\text{Amônia total} = 0,0005 * \text{Absorbância} + 0,0885 \quad (R^2 = 0,996).$$

As concentrações de NH_3 foram calculadas utilizando os cálculos para especiação propostos por (Emerson et al., 1975) para um pH = 8,41 e pK = 9,15 (temperatura de 28°C).

A taxa de letalidade durante o desenvolvimento embriolarval entre 0 e 96 hpf foi quantificada seguindo os critérios previstos pela OECD 236 (OECD, 2013) para estabelecimento da morte dos embriões ou larvas: ausência de somitos após 24 hpf, ausência do destacamento caudal após 24 hpf, coagulação dos ovos entre 24 hpf e 48 hpf, ausência de batimentos cardíacos após 72 hpf. Para avaliação da relação concentração resposta de efeitos letais os embriões e larvas foram expostos à água controle usada nos cultivos e às concentrações de NH_3 de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$, $0,15 \text{ mg L}^{-1}$, $0,74 \text{ mg L}^{-1}$, $1,46 \text{ mg L}^{-1}$, $2,27 \text{ mg L}^{-1}$, $3,03 \text{ mg L}^{-1}$, $3,88 \text{ mg L}^{-1}$ e $4,57$

mg L⁻¹. Para avaliação da relação concentração resposta de efeitos subletais os embriões e larvas foram expostos à água controle usada nos cultivos e às concentrações de NH₃ de 0,03 mg L⁻¹, 0,07 mg L⁻¹, 0,14 mg L⁻¹, 0,30 mg L⁻¹, 0,60 mg L⁻¹, 1,24 mg L⁻¹, 1,70 mg L⁻¹ e 4,89 mg L⁻¹. O volume de água nas diferentes concentrações testadas de NH₃ adicionado em cada poço foi de 2,5 ml, sendo que 2 mL (80%) foram substituídos a cada 24 h. A taxa de decaimento da concentração de NH₃ nas placas foi aferida a cada 24h antes da troca das soluções (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações planejadas (nominais) e quantificadas (reais) de NH₃ durante a exposição de 96 h de embriões e larvas de *Danio rerio*.

Concentrações nominais (mg L ⁻¹)	Concentrações reais (mg L ⁻¹)	Desvio Padrão	Decaimento em 24h (%)	Desvio Padrão
1º Experimento				
0,038	0,022	0,004	89%	0,021
0,076	0,068	0,005	58%	0,038
0,153	0,141	0,029	74%	0,088
0,306	0,335	0,011	56%	0,202
0,611	0,607	0,088	27%	0,187
1,223	1,346	0,124	17%	0,294
2,446	2,527	0,072	13%	0,138
4,891	2,961	1,673	86%	2,208
2º Experimento				
0,076	0,054	0,006	43%	0,003
0,153	0,158	0,003	29%	0,012
0,764	0,854	0,008	19%	0,059
1,529	1,585	0,047	14%	0,143
2,293	2,527	0,072	13%	0,138
3,057	3,419	0,010	28%	0,165
3,822	4,423	0,104	14%	0,270
4,586	5,226	0,031	10%	0,273

2.3. GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS)

O GMS se baseia na atribuição de pontos a estruturas que se desenvolvem no embrião/larva ao longo das primeiras 96 h de desenvolvimento. Cada embrião de cada tratamento foi avaliado individualmente para presença destas características em microscópio invertido DIGILAB® com objetivas de 4 e 10X. Ao final das 96h de exposição uma larva perfeita apresenta um GMS igual a 17, segundo (Beekhuijzen et al., 2015). Neste trabalho o marco morfológico insuflamento da bexiga natatória não previsto por (Beekhuijzen et al., 2015)

também foi avaliado em 96 hpf, e portanto o valor máximo do GMS para uma larva perfeita foi igual a 18 pontos neste trabalho, e reduções no índice indicam atraso no desenvolvimento embrionário.

2.4. FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO

A presença das seguintes patologias ou anomalias morfológicas foi computada para cada larva ao final de 96 hpf: problemas circulatórios (24 hpf), hemorragias (96 hpf), eclosão precoce (48 hpf), curvatura espinhal anormal (72 hpf), Atraso no desenvolvimento da boca (72-96 hpf), Ausência da nadadeira peitoral (72 hpf), edema perivitelínico (96 hpf), edema pericárdico (96 hpf), ausência de insuflamento da bexiga natatória (96 hpf) e vitelo não absorvido completamente (96 hpf). Foram calculadas frequências de ocorrência destas alterações para cada tratamento.

2.5. FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÕES VENTRICULARES

A frequência cardíaca foi aferida em organismos com 48 hpf e 72 hpf. As observações foram realizadas em microscópio invertido DIGILAB® utilizando objetivas de 20X. A aferição é realizada com o auxílio de um cronômetro e são contadas as contrações ventriculares em um período de 30 segundos. Cada tratamento teve 10 organismos aferidos nos estágios 48 hpf e 72 hpf. Os valores de frequência são expressos em contrações ventriculares por segundo.

2.6. MEDIDA MORFOMÉTRICA

Ao final dos testes comportamentais, as larvas foram fotografadas com uma câmera Cannon® PowerShot G10 acoplada em lupa Zeiss® Stemi 2000 C, utilizando aumento de 20X. O comprimento total larval foi medido com uma precisão de 0,1 mm com o software AxioVision (Zeiss®).

2.7. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA E TRAJETÓRIAS

As larvas sobreviventes de cada tratamento foram transferidas individualmente no estágio 7 dpf para arenas de observação representadas por poços de placas de cultivo de células de 12 poços com 3 mL de água. Cada larva dos diferentes tratamentos foi filmada durante 300 s em visão superior usando câmeras de vídeo (modelo VP600H, Intellbras®, São José, Brasil) com lentes de zoom variável de 6-60 mm, e os vídeos gravados em computador através de placa de captura Geovision® modelo GV900A. A velocidade média de natação (cm s^{-1}) realizada pelas larvas durante o período total de 300 s, totalizando 30 intervalos de 10 s, foi calculada pelo software de rastreamento Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking, SMART® (PanLabs, Harvard Apparatus, EUA), que também foi usado para gerar os mapas de trajetória das larvas neste período monitorado.

2.8. PADRÃO DE VARIAÇÃO DAS VELOCIDADES NATATÓRIAS A CADA INTERVALO DE 10S

O tempo total de 300 s de monitoramento de cada larva individualmente também foi analisado em 30 intervalos sequenciais de 10 s separados, dentro dos quais foi quantificado o número de s que a larva permaneceu em repouso (velocidade $\leq 0,05 \text{ cm s}^{-1}$), o número de s que a larva nadou em velocidade lenta (entre 0,05 e 0,5 cm s^{-1}), e o número de s que o indivíduo nadou em velocidade rápida ($> 0,5 \text{ cm s}^{-1}$). Para tal também foi utilizado o software Smart, e as faixas de velocidade nas categorias repouso, lenta e rápida foram previamente estabelecidas em experimentos preliminares com larvas controle. Um total de 17 larvas em média do grupo controle, e $14,9 \pm 5,8$ larvas expostas às diferentes concentrações de NH_3 foram analisadas.

2.9. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

2.9.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A quantificação da atividade da acetilcolinesterase foi adaptada para microplacas a partir do método de (Ellman et al., 1961). Para cada réplica amostral, “pools” de 4 larvas em 96 hpf expostos a água limpa ou NH_3 foram homogeneizados em 100 μL de tampão fosfato de potássio (KPI 0,25 M com pH 7,4) refrigerado e mantido sob gelo, seguido de centrifugação por 4 min em centrífuga refrigerada a 4 °C a 3000g. O princípio da atividade se baseia na quantificação da cor amarelada produzida pela tiocolina quando reage com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB), formando o TNB quantificado por absorbância no espectro fluorímetro, SpectraMax® M3 utilizando um comprimento de onda de 415 nm. O cálculo foi baseado no coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a AChE expressa em $\text{nmol de TNB min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

2.9.2. Glutathione-S-Transferase (GST)

O método para leitura da atividade da GST foi adaptado pra microplaca a partir do método de (Habig et al., 1974). As réplicas e processo de homogeneização foi o mesmo utilizado para a quantificação da AChE. A atividade da GST foi determinada a partir da conjugação da glutathione (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado a 340 nm no espectro fluorímetro, SpectraMax® M. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a GST expressa em $\text{nmol de CDNB min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$

2.9.3. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O método utilizado para a leitura das ERO (Zhao et al., 2013) foi quantificado utilizando diacetato 2,7-Diclorofluorescina (DCF-DA). Para cada réplica amostral, “pools” de 10 larvas 96 hpf expostos a água limpa ou NH_3 foram homogeneizadas com 100 μL de

tampão fosfato de sódio (PBS pH 7,4) e centrifugadas por 30 min, 4 °C a 12000 g. Em uma placa de 96 poços foi inserido 20 µL de amostra, 200 µL de tampão fosfato salino PBS pH 7,4 e 8,3 µL de DCF-DA 1 mg mL⁻¹ posteriormente a placa foi incubada por 30 min a 37 °C. Após o período de incubação foi lida a fluorescência com a excitação em 485 nm e a emissão em 520 nm, e a ERO expressa em (%) unidade de fluorescência Relativa (UFR) mg proteína⁻¹.

2.9.4. Catalase

A catalase (CAT) foi caracterizada pela leitura do consumo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) seguindo o método de (Beers and Sizer, 1952) adaptado para microplacas por (Li and Schellhorn, 2007). Para cada réplica amostral, “pools” de 10 larvas 96 hpf expostos a água limpa ou NH₃ foram homogeneizadas em 100 µL de tampão e centrifugada por 30 min, 4 °C a 12000g. A reação foi quantificada por leitura de absorvância a 240 nm. A atividade foi calculada mediante coeficiente de absorvância molar ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de decomposição de consumo do peróxido de hidrogênio, e a CAT expressa em nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

2.9.4. Quantificação de Proteínas

A quantificação das proteínas totais em cada amostra utilizada nos ensaios enzimáticos foi realizada pelo método de (Bradford, 1976). A leitura de absorvância foi realizada utilizando 595 nm e 450 nm. A razão entre os valores obtidos em ambos os comprimentos de onda são aplicados em uma curva analítica expressando a relação entre as razões de absorvância (eixo X) e as concentrações de albumina bovina (BSA $\geq 96\%$ pureza, Sigma Aldrich), ($R^2 > 0.99$).

2.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

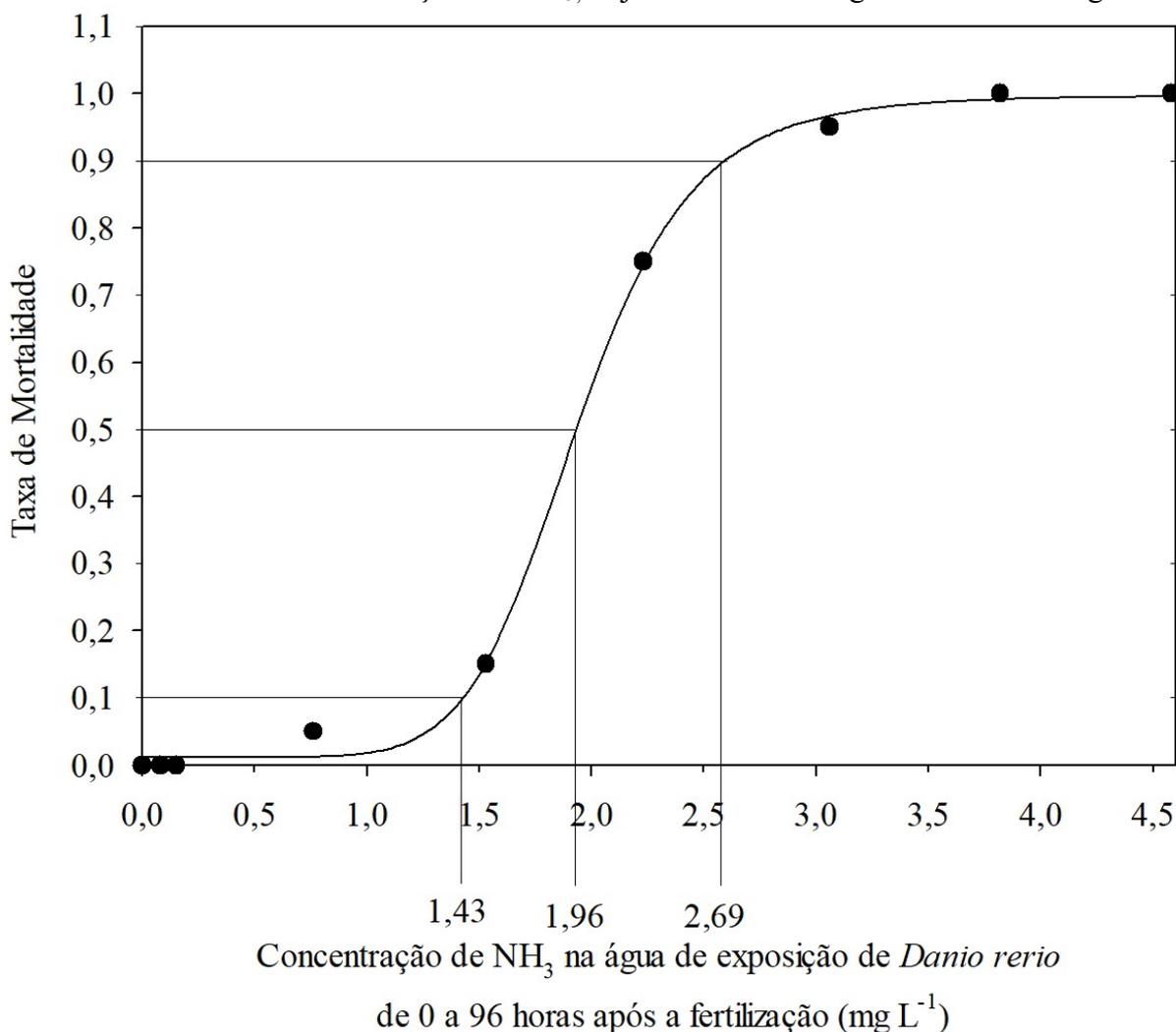
A análise da relação concentração resposta e cálculo da concentração letal para 50% dos organismos expostos em um período de 96 h (CL50_{96h}) foi realizada com base no modelo logístico presente no pacote drc (Ritz et al., 2016) utilizando-se o software R 4.0.2 (R Core Team, Áustria). Os biomarcadores bioquímicos, índice GMS, frequência cardíaca, comprimento total e parâmetros comportamentais natatórios foram analisados mediante comparação com seus respectivos controles por ANOVA quando houve normalidade dos dados e homoscedasticidade, ou por Kruskal-Wallis na ausência destas premissas. Quando diferenças foram detectadas, testes de comparação múltipla com os controles de Dunnett (ANOVA) e Dunn (Kruskal Wallis) foram utilizados, com o software Sigmaplot 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha). Diferenças estatísticas nas frequências de anormalidades foram avaliadas mediante teste-t para proporções utilizando o software Statistic Calculator (StatPac, Northfield, USA).

3. RESULTADOS

3.1. TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

O NH_3 foi letal para 100% dos organismos a partir do tratamento $4,423 \text{ mg L}^{-1}$ e não foi encontrada mortalidade para os tratamentos inferiores a $0,158 \text{ mg L}^{-1}$. A partir das porcentagens de organismos mortos por tratamento foi possível calcular a CL50 para fase embriolarval do *Danio rerio* exposto por 96 hpf. A concentração letal foi quantificada pelo ajuste logístico da concentração resposta. A concentração letal para 50% dos organismos $\text{CL}_{50_{96\text{h}}} = 1,96 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de NH_3 (Figura. 1).

Figura 1. Taxa de mortalidade para a fase embriolarval de *Danio rerio* exposto por 96h a diferentes concentrações de NH_3 , e ajuste dos dados segundo o modelo logístico.

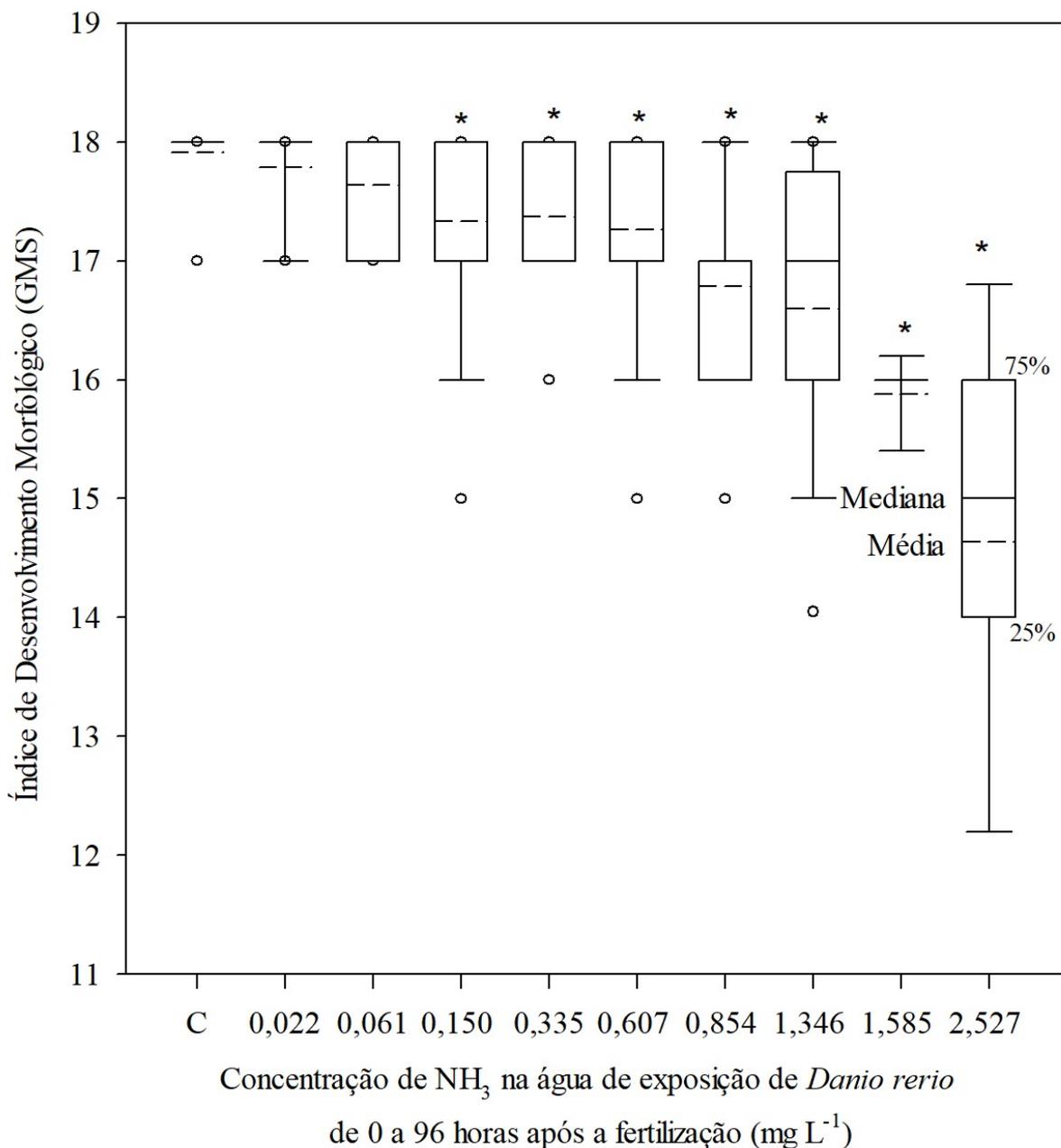


3.2. GENERAL MORPHOLOGY SCORE (GMS)

O índice GMS apresentou redução estatística em todos os tratamentos superiores a $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ quando comparados ao controle. (Figura 2). As estruturas não desenvolvidas no processo embrionário que mais influenciaram a redução do índice GMS foram: circulação ausente,

vitelo não absorvido e bexiga não insuflada. As ausências dessas estruturas também foram consideradas patológicas e estão representadas por frequência na tabela 2.

Figura 2. Índice de desenvolvimento morfológico “GMS” da fase embrionária de *Danio rerio* exposto durante 96 h a concentrações crescentes de NH_3 (Kruskal-Wallis $H = 126,86$ $p \leq 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



3.3. FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO

Dentre as patologias observadas durante o ensaio os problemas circulatórios e a frequência de organismos sem insuflar a bexiga natatória foi expressiva. A concentração de efeito não observado (CENO) para falha circulatória em 24 hpf foi igual a $0,061 \text{ mg L}^{-1}$ de NH_3 , sendo um parâmetro sensível na avaliação da toxicidade por NH_3 . A ausência do

insuflamento da bexiga natatória foi igualmente sensível as diluições de NH_3 , sendo sua CENO $0,061 \text{ mg L}^{-1}$. Outras duas patologias que se destacaram foram a eclosão precoce que alcançou 45% das larvas expostas no tratamento $2,96 \text{ mg L}^{-1}$ e o atraso no desenvolvimento da boca que acometeu 47,5% das larvas expostas também no tratamento $2,96 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência (%) de patologias em larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição a diferentes concentrações de NH₃.

Tratamentos NH ₃ (mg L ⁻¹)	Circulação sanguínea lenta ou ausente (24 hpf)	Hemorragia (96 hpf)	Eclosão prematura (48 hpf)	Curvaturas da notocorda (96 hpf)			Atraso no desenvolvimento da boca (72 e 96 hpf)	Ausência de nadadeira peitoral (96 hpf)	Edema no Vitelo (96 hpf)	Edema Pericárdico (96 hpf)	Bexiga não Insuflada (96 hpf)	Vitelo não Absorvido (96 hpf)
				Lordose	Cifose	Escoliose						
Controle	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,9%	0,0%
0,022	0,0%	5,0%	10,5%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
0,061	0,0%	2,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	2,5%	0,0%	0,0%	27,5%*	2,5%
0,150	10,0%*	2,5%	12,5%*	2,5%	0,0%	0,0%	2,5%	7,5%*	0,0%	0,0%	15,0%*	5,0%
0,335	20,0%*	0,0%	25,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	5,0%	5,0%	0,0%	0,0%
0,607	10,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	35,0%*	0,0%
0,854	20,0%*	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	75,0%*	20,0%*
1,346	20,0%*	0,0%	25,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%*	20,0%*
1,585	20,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	80,0%*	5,0%
2,527	17,5%*	2,5%	17,5%*	7,5%	5,0%	5,0%	47,5%*	20%*	5,0%	12,5%*	15,0%*	20,0%*
2,961	30,0%*	0,0%	45,0%*	10%*	0,0%	0,0%	-	-	0,0%	0,0%	-	-
3,419	40,0%*	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%*	5,0%	10,0%*	5,0%	5,0%	5,0%
4,423	35,0%*	5,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	5,0%	5,0%	10,0%*	0,0%	-	-
5,226	45,0%*	0,0%	15,0%*	10%*	0,0%	0,0%	-	-	30,0%*	0,0%	-	-

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$

3.4. FREQUÊNCIAS CARDÍACAS

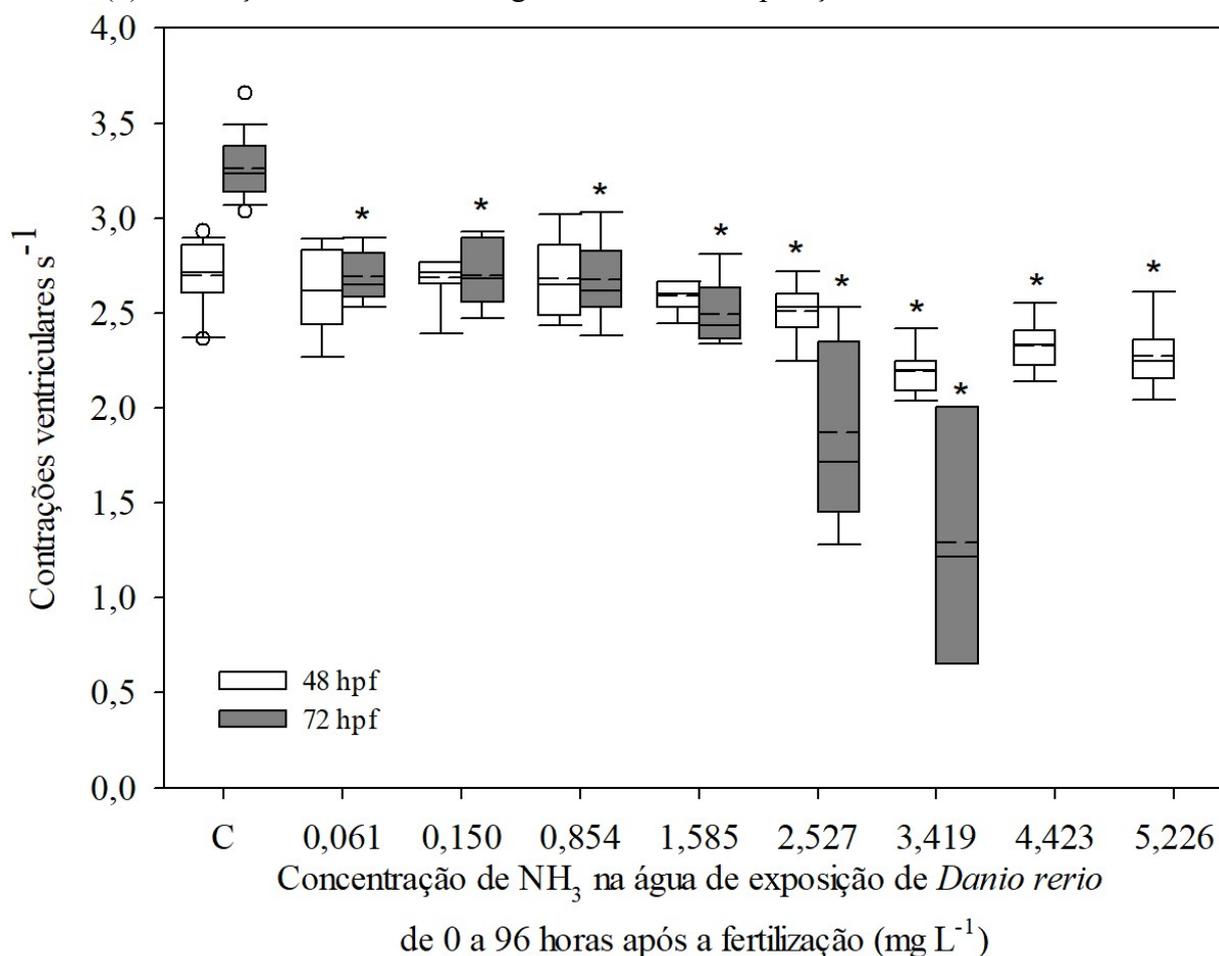
A frequência cardíaca em 48 hpf reduziu estatisticamente nos tratamentos 2,53 mg L⁻¹, 3,42 mg L⁻¹, 4,42 mg L⁻¹ e 5,23 mg L⁻¹. Em 72 hpf houve redução estatística na frequência cardíaca em todos os tratamentos (Figura 3). Em 72 h de experimento os organismos dos tratamentos 4,42 mg L⁻¹ e 5,23 mg L⁻¹ já estavam mortos, inviabilizando a coleta dos dados.

Figura 3. Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n = 10) expostas a concentrações crescentes de NH₃.

48 hpf: (ANOVA F = 16,689 p < 0,001; teste de Dunnett, p < 0,05)

72 hpf: (Kruskal-Wallis H = 61,85 p ≤ 0,001; teste de Dunn, p < 0,05).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



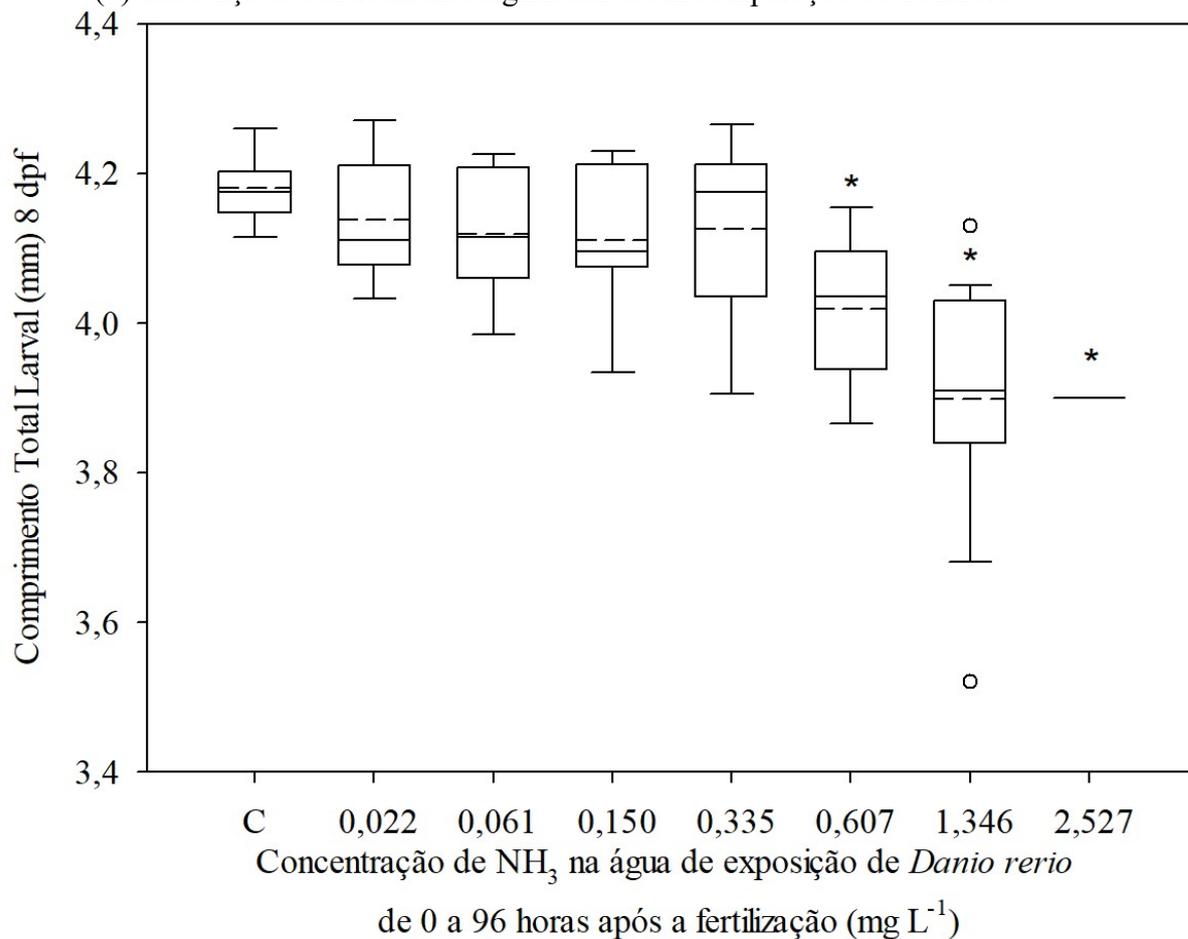
3.5. MEDIDA MORFOMÉTRICA

Os organismos expostos aos tratamentos 0,607, 1,35 e 2,53 mg NH₃ L⁻¹ tiveram seu comprimento total larval estatisticamente menor que o controle (Figura 4).

Figura 4 Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias pós fertilização (dpf) após exposição a concentrações crescentes de NH₃.

(Kruskal-Wallis H = 47,699; p ≤ 0,001; teste de Dunn; p < 0,05).

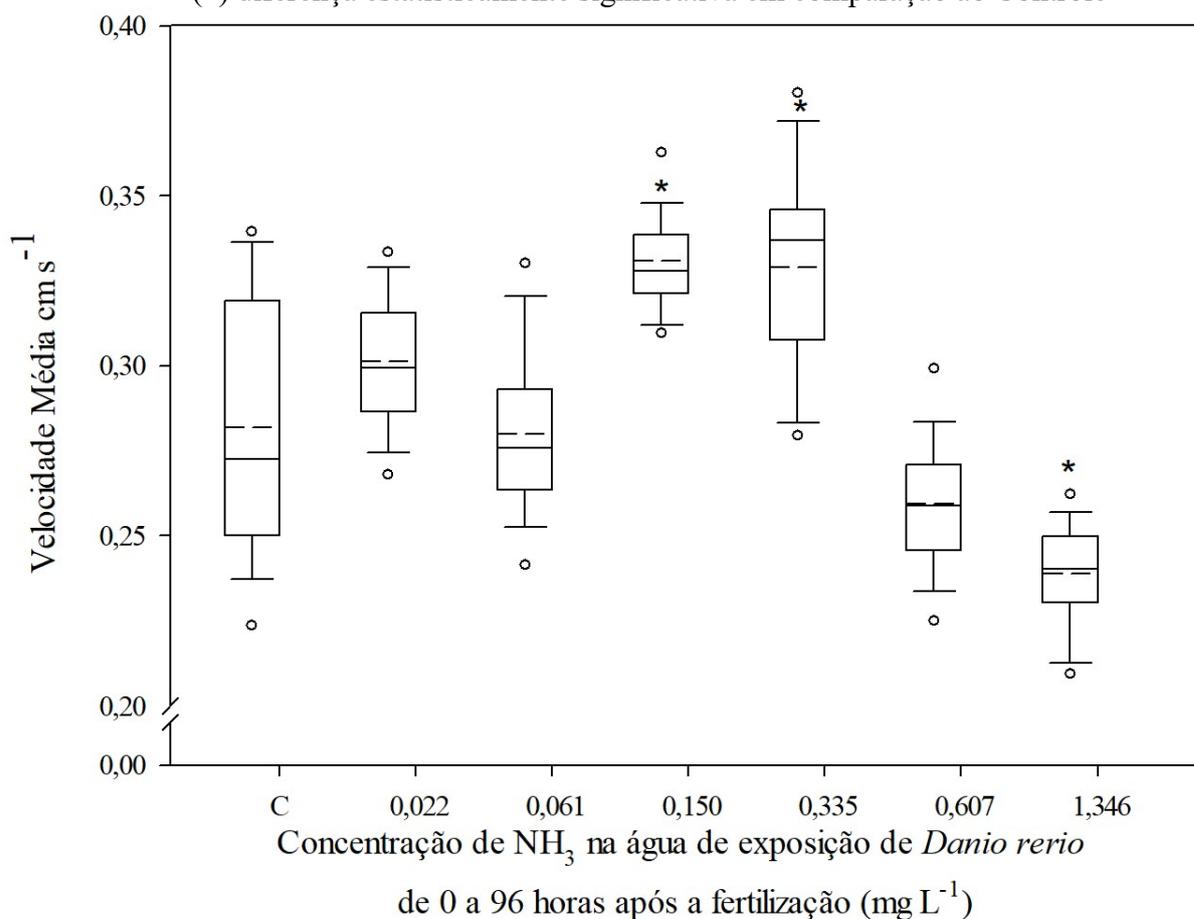
(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



3.6. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA E TRAJETÓRIAS

A velocidade média natatória (30 intervalos de 10s) apresentou aumento significativo nos tratamentos 0,15 mg L⁻¹ e 0,335 mg L⁻¹, enquanto que nos tratamento 1,346 mg L⁻¹ houve redução estatística (Figura 5).

Figura 5. Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de *Danio rerio* 168 hpf expostos a concentrações crescentes de NH₃. (Kruskal-Wallis H =139,09; p ≤ 0,001; teste de Dunn, p < 0,05). (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



A análise detalhada do padrão de natação das larvas controle em intervalos de 10s ao longo de todo o período monitorado (30 intervalos de 10s) revelou que as mesmas apresentam um padrão consistente de natação em que permanecem em média 74% do tempo em repouso (velocidade ≤ 0,05 cm s⁻¹) (Figura 6A), 17% em natação lenta (entre 0,05 e 0,5 cm s⁻¹) (Figura 6C), e 8% em natação rápida (> 0,5 cm s⁻¹) (Figura 6B). A fração de tempo que as larvas permanecem em repouso diminuiu nos tratamentos 0,022, 0,607 e 1,35 mg L⁻¹ e a fração de tempo que as larvas nadaram rapidamente aumentou nas larvas expostas aos tratamentos 0,022, 0,061, 0,150, 0,335, e 0,607 mg L⁻¹.

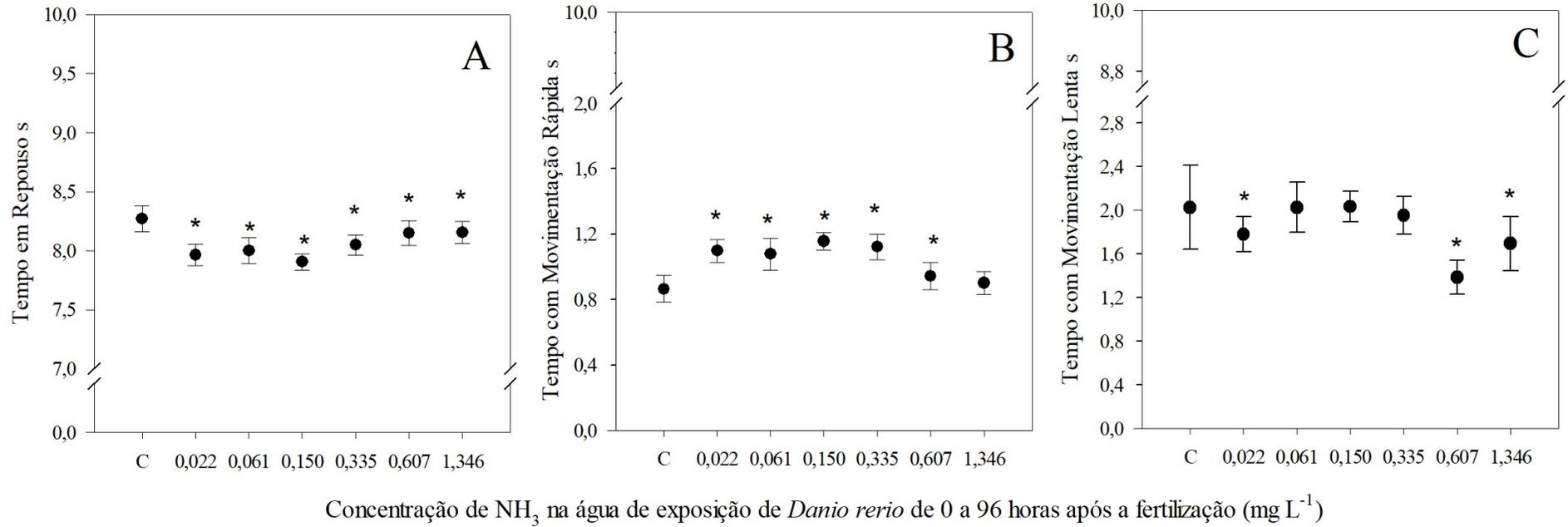
Figura 6. Fração do tempo total de 10s de monitoramento da atividade natatória em que as larvas de *Danio rerio* 168 hpf expostas a diferentes concentrações de NH_3 se mantiveram em repouso (A), em natação rápida (B), ou em natação lenta (C).

A: (ANOVA $F = 53,27$ $p < 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$);

B: (ANOVA $F = 68,93$ $p < 0,001$; teste de Dunnett, $p < 0,05$)

C: (Kruskal-Wallis $H = 105,78$ $p \leq 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



3.7. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A atividade da enzima AChE apresentou redução significativa nas larvas expostas aos tratamentos 0,607, 1,346 e 2,53 mg L⁻¹, sendo a atividade 24, 34 e 37 %, representativamente menores que a apresentada pelas larvas do controle (Figura 7A) que apresentou em média de 0,567 ± 0,15 nmol TNB min⁻¹ mg proteína⁻¹.

Figura 7. Biomarcadores bioquímicos quantificados em *Danio rerio* após 96 h de exposição a concentrações crescentes de NH₃.

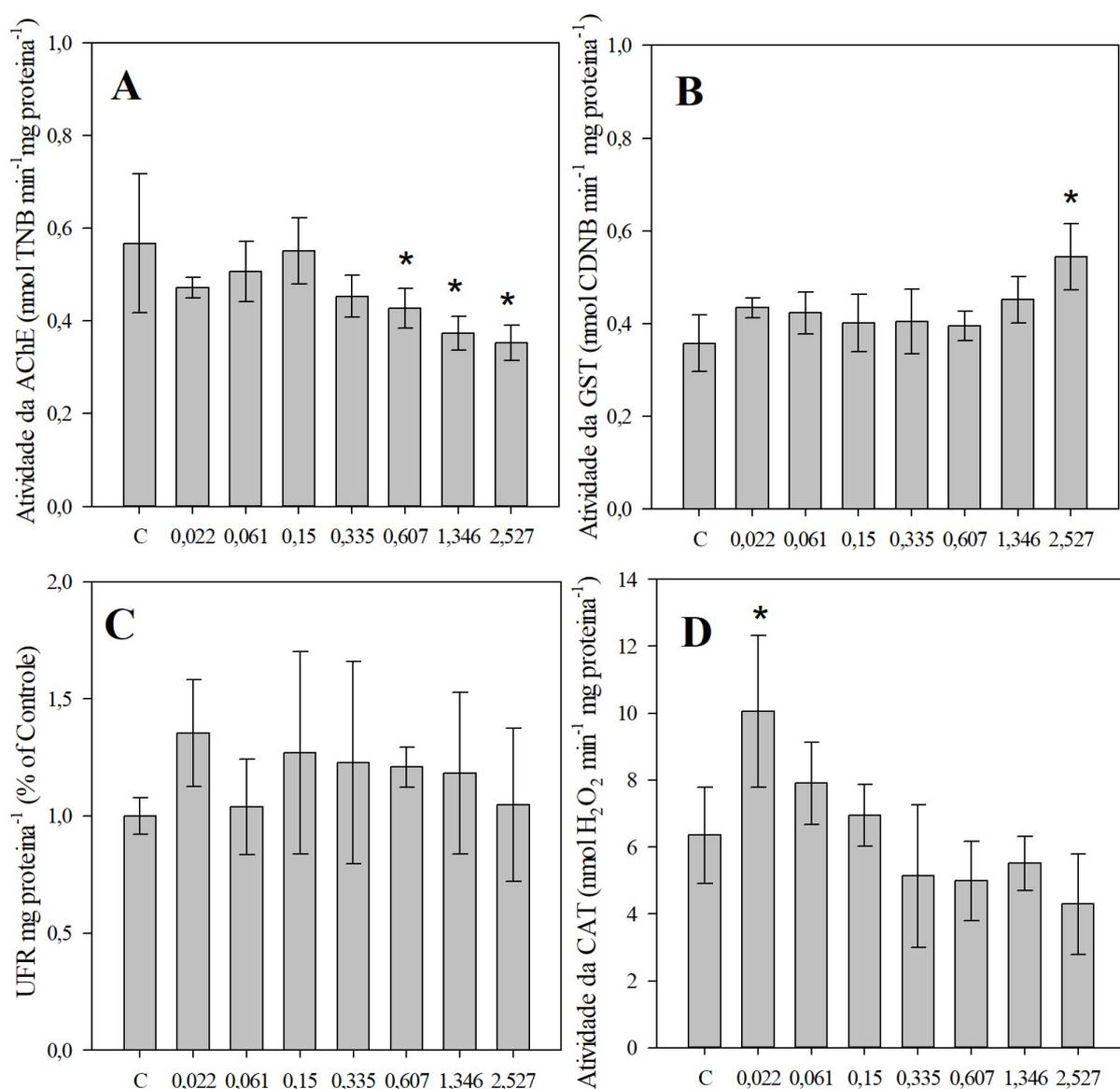
A: Acetilcolinesterase (AChE); (n = 4; ANOVA F = 4,9 p = 0,001; Dunnett, p < 0,05)

B: Glutathiona-s-transferase (GST); (n = 4; ANOVA F = 4,1, p = 0,004; Dunnett, p < 0,05)

C: Espécies reativas de oxigênio (ERO); (n = 4; Kruskal-Wallis H = 6,8, p = 0,446) unidade de fluorescência relativa ao controle (UFR)

D: Catalase (CAT) (n = 4; ANOVA F = 5,7, p ≤ 0,001; teste de Dunnett, p < 0,05).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle



Concentração de NH₃ na água de exposição de *Danio rerio* de 0 a 96 horas após a fertilização (mg L⁻¹)

3.8. BIOMARCADOR BIOQUÍMICO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST apresentou aumento estatístico no tratamento 2,53 mg L⁻¹ com relação ao tratamento controle que apresentou média 0,36 nmol CDNB min⁻¹ proteína⁻¹ (Figura 7B). A atividade da GST no tratamento 2,53 mg L⁻¹ foi 52% maior que atividade do controle.

3.9. MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO CATALASE (CAT) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

3.9.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A presença de ERO foi expressa em unidades de fluorescência relativa ao controle, e não foram verificadas diferenças significativas entre as larvas de *Danio rerio* expostas a NH₃ e ao controle (Figura 7C).

3.9.2 Catalase

A atividade da catalase foi induzida em 58% nas larvas expostas a 0,022 mg NH₃ L⁻¹, comparada à atividade dos controles, igual a 7,42 nmol min⁻¹ proteína⁻¹ (Figura 7D).

4. DISCUSSÃO

A amônia não ionizada NH₃ induziu uma série de alterações biológicas letais e subletais de modo concentração dependente ao longo do desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio*. Em termos de efeitos subletais, patologias significativas verificadas incluíram um aumento dose dependente da frequência de embriões em 24 hpf com falhas na circulação sanguínea, associada a uma diminuição dose dependente da frequência de contrações ventriculares, aumento dose dependente de atraso no desenvolvimento embriolarval com base no índice “GMS”, e uma diminuição dose dependente do comprimento total das larvas. Outras anormalidades do desenvolvimento com aumento parcialmente dose dependente foram as frequências de larvas com eclosão prematura, e falha na absorção do vitelo e no insuflamento da bexiga natatória.

A CL50_{96h} estimada neste trabalho para o estágio embriolarval de *D. rerio* igual a 1,96 mg NH₃ L⁻¹ (Figura 1) foi próxima da CL50_{96h} estimada para juvenis de *Rhamdia quelen* de 2,09 mg NH₃ L⁻¹ (Miron *et al.*, 2008), e está também próxima da média da CL50 aguda igual a 2,79 mg NH₃ L⁻¹ encontrado para 32 espécies de teleósteos de água doce segundo levantamento de dados da USEPA (Randall e Tsui, 2002). As larvas de *Danio rerio* neste trabalho se mostraram mais resistentes que as larvas de *Fathead minnow* que apresentaram CL50_{96h} de 0,87 mg NH₃ L⁻¹ (Fairchild *et al.*, 2005). A inclinação acentuada da curva de mortalidade entre a concentração de NH₃ de exposição das larvas de *Danio rerio* versus a taxa

de mortalidade obtido com os dados deste trabalho indica que a partir da concentração a 1,2 mg NH₃ L⁻¹ há um rápido aumento das taxas de mortalidade que atinge valores acima de 80% em 2,5 mg NH₃ L⁻¹ (Figura 1).

A USEPA estabelece dentro de seus critérios de qualidade de água para a proteção da vida aquática concentrações limite máximas aceitáveis de amônia para exposição aguda (1 hora) e exposição crônica (30 dias) iguais a 0,0673 e 0,0075 mg NH₃ L⁻¹, respectivamente (Usepa, 2013). O limite para proteção da vida aquática proposto para toxicidade aguda de 0,0673 mg NH₃ L⁻¹ já seria capaz de provocar alterações biológicas subletais em *Danio rerio* após exposição entre 24 e 96 h a NH₃, como demonstrado neste trabalho. A frequência de larvas de *Danio rerio* com eclosão prematura em 48 hpf aumentou de modo concentração dependente a partir de 0,02 mg NH₃ L⁻¹, foi verificada diminuição da frequência de contrações ventriculares em 72 hpf a partir de 0,06 mg NH₃ L⁻¹, e a frequência de larvas com falhas no insuflamento da bexiga natatória em 96 hpf aumentou a partir de 0,06 mg NH₃ L⁻¹.

A circulação sanguínea nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário é importante para o desenvolvimento de órgãos como o fígado e da bexiga natatória de *Danio rerio* (Korzhan *et al.*, 2008; Winata *et al.*, 2010). A energia absorvida do vitelo neste estágio da vida do *D. rerio* é comumente dividida principalmente entre os tecidos recém-formados e processos respiratórios dentro do ovo (Kamler, 2007). O aumento dose dependente da frequência de embriões em 24 hpf com falhas na circulação sanguínea, que atingiu 10% dos embriões na concentração de 0,15 mg NH₃ L⁻¹ e afetou 45% dos embriões na maior concentração de 5,2 mg NH₃ L⁻¹, pode ter influenciado no desenvolvimento embriolarval.

Os danos causados pelos problemas circulatórios ainda podem ter se estendido e alterado o GMS e contribuído para o crescente número de mortos a partir da concentração 0,85 mg NH₃ L⁻¹, em que são detectadas frequências de larvas com circulação lenta ou ausente iguais ou superiores a 20% (Tabela 2). É importante ressaltar que os problemas circulatórios constatados podem estar diretamente relacionados à verificada diminuição na frequência cardíaca entre 48 e 72 hpf apresentada neste trabalho (Figura 3). Problemas na frequência cardíaca já foram encontrados em estágios embriolarvais de *Danio rerio* expostos a diferentes grupos de compostos, entre eles: congêneres de éteres difenílicos polibromados (PBDE) utilizado em espumas de poliuretano (Lema *et al.*, 2007), e sedimentos contaminados por cobre e HPAs (Hallare *et al.*, 2005).

Foi observado neste estudo que a exposição das fases embriolarvais do *Danio rerio* a concentrações de NH₃ tipicamente resulta em letalidade aumentada significativamente a partir da eclosão das larvas. Embora o armazenamento de amônia no vitelo possa representar um

mecanismo pelo qual os níveis de amônia dentro do corpo do embrião são minimizados, o mecanismo primário para excreção de nitrogênio antes da eclosão é a produção de uréia. Após a eclosão as larvas passam a excretar nitrogênio na forma de amônia por um processo que envolve a difusão de amônia para o meio externo aquático (Kumai *et al.*, 2015; Zimmer *et al.*, 2017). A exposição à água com concentrações significativas de amônia após a eclosão dificulta este processo de excreção por difusão e pode levar o organismo ao quadro de hiperamônemia (Zimmer *et al.*, 2010; Bucking *et al.*, 2013; Feldman *et al.*, 2014). Além disso, o aumento da frequência de larvas com eclosão prematura a partir da 0,02 mg NH₃ L⁻¹ também pode ter vulnerabilizado o embrião precocemente, deixando ele diretamente exposto as maiores concentrações de amônia na água circundante. Outros contaminantes que também induzem a eclosão precoce de larvas de *Danio rerio* são o tributilestanho (Liang *et al.*, 2017) e o inseticida piretróide bifenthrin (Jin *et al.*, 2009).

Marcos morfológicos do desenvolvimento embriolarval de *D. rerio* que também apresentaram atraso após exposição a NH₃ incluíram o desenvolvimento da mandíbula, a falha na absorção completa do vitelo e no insuflamento da bexiga natatória (Tabela 2). Estes marcos do desenvolvimento também contribuíram significativamente para os decréscimos no índice GMS detectados a partir de 0,15 mg NH₃ L⁻¹ (Figura 2). Os atrasos no desenvolvimento do aparato mandibular e do insuflamento da bexiga natatória encontrados podem acarretar em consequências para processos como captura de presas que depende diretamente do desenvolvimento da boca protrusível (Eve Robinson *et al.*, 2019), assim como de flutuabilidade neutra fundamental para um adequado desempenho natatório (Müller e Van Leeuwen, 2004; Czesny *et al.*, 2005).

O comprimento total das larvas em 168 hpf expostas a 0,607, 1,35 e 2,53 mg NH₃ L⁻¹ foi reduzido, indicando decréscimo no crescimento em comprimento (Figura 4), concentrações em que maiores frequências de anormalidades patológicas também foram encontradas (Tabela 2). Fatores como problemas circulatórios que podem afetar a absorção do vitelo podem contribuir diretamente para redução do desenvolvimento embriolarval e consequentemente reduções no comprimento da larva. Reduções no comprimento total larval de *D. rerio* no estágio 168 hpf já foram relatadas associadas a patologias como curvaturas na notocorda e malformações de tecidos ósseos em fases embriolarvais de *D. rerio* expostos a PAH (Incardona *et al.*, 2004), mas também por realocação energética para excreção de amônia em adultos de *Oryzias melastigma* (Gao *et al.*, 2017). A frequência de larvas com patologias na curvatura da notocorda não aumentou de forma concentração dependente, e lordoses foram detectadas em 10% das larvas em 72 hpf após exposição a 2,9 e 5,2 mg NH₃

L^{-1} , sugerindo que as reduções do crescimento detectadas não estejam relacionadas a patologias na notocorda durante a fase embriolarval. O direcionamento de recursos energéticos para fins de desintoxicação, somados a aumento da frequência de larvas com falhas na absorção do vitelo (Tabela 2) podem ter afetado o processo de crescimento, visto que a larva poderia estar destinando energia para um aumento do processo de excreção de nitrogênio por ureogênese (Kumai *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017).

A indução na atividade da GST após exposição das larvas a maior concentração de 2,5 mg $NH_3 L^{-1}$ pode ser uma resposta as possíveis alterações fisiológicas, visto que a GST atua também em processos antioxidantes. A GST é comumente utilizada como biomarcador de contaminação por xenobióticos sendo induzida por diferentes grupos de contaminantes como fungicidas (Han *et al.*, 2016), pesticidas (Maharajan *et al.*, 2018) e alguns hidrocarbonetos aromáticos (Nahrgang *et al.*, 2009).

As consequências negativas da exposição de organismos aquáticos a contaminantes que afetam diretamente funções comportamentais como a natação, o forrageio, fuga de predadores, reprodução e interação social, podem gerar danos as suas funções ecológicas (Scott e Sloman, 2004). Diferentes fatores podem ter influenciado diretamente na alteração nos padrões natatórios avaliados neste trabalho, dentre eles destaca-se a falha no insuflamento da bexiga natatória e a redução na atividade da AChE (Müller e Van Leeuwen, 2004; Tilton *et al.*, 2011). Este trabalho encontrou um aumento na velocidade natatória espontânea média das larvas em 168 hpf expostas a 0,15 e 0,335 mg $NH_3 L^{-1}$, e uma diminuição da velocidade natatória após exposição a 0,6 (não significativa estatisticamente) e 1,3 mg $NH_3 L^{-1}$ (Figura 5). Neste trabalho também foi detectado um aumento da proporção do tempo que as larvas se mantiveram nadando em velocidade rápida de 0,8s nos controles (8% do tempo) para aproximadamente 1,1s nas concentrações de 0,02 e 0,33 mg $NH_3 L^{-1}$ (11% do tempo). Este aumento estatisticamente significativo, mas relativamente pequeno do percentual total de tempo que as larvas desenvolveram velocidades natatórias rápidas também sugerem uma hiperatividade natatória (Figura 6B). Adultos de *D. rerio* expostos a concentrações elevadas de 17, 25 e 38 mg $NH_3 L^{-1}$ desenvolveram perda de equilíbrio, decréscimo da atividade natatória, escurecimento da pele e congestão branquial (Al-Zaidan *et al.*, 2013). Por outro lado, a exposição de adultos da espécie *Oncorhynchus mykiss* a concentrações entre 0,02 e 0,08 mg $L^{-1} NH_3$ causou uma perda da resistência natatória (Wicks *et al.*, 2002), enquanto a resistência natatória na foi alterada após a exposição de *Deltistes luxatus* a concentrações entre 0,11 e 0,37 mg $L^{-1} NH_3$ (Meyer e Hansen, 2002).

A AChE que é responsável pela finalização do impulso nervoso nas fendas sinápticas desencadeada pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), e sua alteração pode gerar uma série de complicações comportamentais e cognitivas (Beauvais *et al.*, 2001; Vuaden *et al.*, 2012). Este trabalho encontrou redução estatística na atividade da AChE nas larvas expostas a 0,607, 1,35 e 2,53 mg NH₃ L⁻¹ (Figura 7A), sendo que nas concentrações 0,6 e 1,35 mg NH₃ L⁻¹ a inibição da AChE também esteve associada a hipoatividade natatória (Figura 5). De modo semelhante, a hipoatividade expressa pela redução da velocidade natatória espontânea também foi correlacionada com a inibição da AChE em larvas de *Oreochromis niloticus* (Pessoa *et al.*, 2011) e em *Oncorhynchus mykiss* (Brewer *et al.*, 2001) expostos a inseticidas inibidores da colinesterase.

Organismos expostos a uma situação de estresse ou ansiedade tendem a desenvolver a tigmotaxia, o fenômeno é uma forma de se manter seguro de uma possível predação ou ameaça (Schnörr *et al.*, 2012; Shams *et al.*, 2015). A tigmotaxia encontrada com maior frequência a partir do tratamento 0,15 mg L⁻¹ nos mapas de trajetória (Figura 8 Anexo 2) pode ser parte do efeito do estresse da exposição a amônia tóxica.

CONCLUSÃO

A exposição de *Danio rerio* na fase embriolarval de 0 a 168 hpf a NH₃ em concentrações ambientalmente relevantes pode acarretar efeitos letais e subletais, incluindo retardo no desenvolvimento embriolarval, falhas no sistema circulatório, batimentos cardíacos e aceleração do processo de eclosão. Além disso, o atraso na formação de estruturas como a mandíbula e no insuflamento da bexiga natatória, bem como a alteração das habilidades natatórias pode comprometer a viabilidade das larvas após o período de consumo do vitelo. O levantamento do potencial tóxico de NH₃ para múltiplos parâmetros ecotoxicológicos em *D. rerio* é relevante tendo em vista o crescente uso da espécie em avaliações ecotoxicológicas de amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

- AL-ZAIDAN, A. S. et al. A toxicity bioassay study concerning the effect of un-ionized ammonia on the mucus cells response originating from the gills of zebrafish *Danio rerio*. **Fisheries Science**, v. 79, n. 1, p. 129-142, 2013/01/01 2013. ISSN 1444-2906.
- BANERJEE, B. et al. Molecular characterization and ornithine-urea cycle genes expression in air-breathing magur catfish (*Clarias magur*) during exposure to high external ammonia. **Genomics**, 2019/12/26/ 2019. ISSN 0888-7543.

BEAUVAIS, S. L. et al. Cholinergic and Behavioral Neurotoxicity of Carbaryl and Cadmium to Larval Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 1, p. 84-90, 2001. ISSN 0147-6513.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952. ISSN 0021-9258.

BOTELHO, R. G. et al. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Piracicaba River (São Paulo, Brazil). **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 20, n. 7, p. 4382-95, Jul 2013. ISSN 0944-1344.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976. ISSN 0003-2697.

BREWER, S. K. et al. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 40, n. 1, p. 70-6, Jan 2001. ISSN 0090-4341 (Print)0090-4341 (Linking).

BUCKING, C.; LEMOINE, C. M.; WALSH, P. J. Waste nitrogen metabolism and excretion in zebrafish embryos: effects of light, ammonia, and nicotinamide. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 319, n. 7, p. 391-403, Aug 2013. ISSN 1932-5223.

CAMARGO, J.; ALONSO, A. Ecological and Toxicological Effects of Inorganic Nitrogen Pollution in Aquatic Ecosystems: A Global Assessment. **Environment international**, v. 32, p. 831-49, 09/01 2006.

CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D. S.; DETTMERS, J. M. Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 134, n. 4, p. 1011-1020, 2005.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961 1961. ISSN 0006-2952. Disponível em: < 13726518 >.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010. ISSN 0166-445X.

EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975/12/01 1975. ISSN 0015-296X.

EVE ROBINSON, H. et al. Predation strategies of larval clownfish capturing evasive copepod prey. **Marine Ecology Progress Series**, v. 614, p. 125-146, 2019.

FAIRCHILD, J. F. et al. Chronic Toxicity of Un-ionized Ammonia to Early Life-Stages of Endangered Colorado Pikeminnow (*Ptychocheilus lucius*) and Razorback Sucker (*Xyrauchen texanus*) Compared to the Surrogate Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 378-384, 2005/10/01 2005. ISSN 1432-0703.

FELDMAN, B.; TUCHMAN, M.; CALDOVIC, L. A zebrafish model of hyperammonemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 1, p. 142-147, 2014/09/01/ 2014. ISSN 1096-7192.

GAO, N. et al. Effects of chronic ammonia exposure on ammonia metabolism and excretion in marine medaka *Oryzias melastigma*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 65, p. 226-234, 2017/06/01/ 2017. ISSN 1050-4648.

GONÇALVES, A. F. et al. Cortisol plays a role in the high environmental ammonia associated suppression of the immune response in zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 249, p. 32-39, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0016-6480.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HALLARE, A. V. et al. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Science of The Total Environment**, v. 347, n. 1, p. 254-271, 2005/07/15/ 2005. ISSN 0048-9697.

HAN, Y. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 13-19, 2016/10/01/ 2016. ISSN 0048-3575.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 4/15/ 2004. ISSN 0041-008X.

IP, Y. K. et al. Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: A review. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 7, p. 565-575, 2004.

JIN, M. et al. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 347-354, 2009/12/13/ 2009. ISSN 0166-445X.

KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, n. 2, p. 143, 2007/08/18 2007. ISSN 1573-5184.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976.

KORZH, S. et al. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. **BMC Developmental Biology**, v. 8, n. 1, p. 84, 2008/09/16 2008. ISSN 1471-213X.

KUMAI, Y. et al. Nitrogenous Waste Handling by Larval Zebrafish *Danio rerio* in Alkaline Water. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, n. 2, p. 137-145, 2015.

LEMA, S. C. et al. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). **Aquatic Toxicology**, v. 82, n. 4, p. 296-307, 5/31/ 2007. ISSN 0166-445X.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of biomolecular techniques : JBT**, v. 18, n. 4, p. 185-187, 2007/09// 2007. ISSN 1524-0215.

LIANG, X. et al. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. **Chemosphere**, v. 189, p. 498-506, 2017.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, 2018/03/01/ 2018. ISSN 0166-445X.

MEYER, J. S.; HANSEN, J. A. Subchronic Toxicity of Low Dissolved Oxygen Concentrations, Elevated pH, and Elevated Ammonia Concentrations to Lost River Suckers. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 131, n. 4, p. 656-666, 2002/07/01 2002. ISSN 0002-8487.

MIRON, D. D. S. et al. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture**, v. 277, n. 3, p. 192-196, 2008/06/03/ 2008. ISSN 0044-8486.

MÜLLER, U. K.; VAN LEEUWEN, J. L. Swimming of larval zebrafish: ontogeny of body waves and implications for locomotory development. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 5, p. 853, 2004.

NAHRGANG, J. et al. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 309-319, 2009.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

PESSOA, P. C. et al. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 312-320, 2011. ISSN 0166-445X.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.

RITZ, C. et al. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2016.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 367-374, 2012/03/17/ 2012. ISSN 0166-4328.

SCHWEIZER, M. et al. The importance of sediments in ecological quality assessment of stream headwaters: embryotoxicity along the Nidda River and its tributaries in Central Hesse, Germany. **Environ Sci Eur**, v. 30, n. 1, p. 22, 2018. ISSN 2190-4707 (Print)2190-4715.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquat Toxicol**, v. 68, n. 4, p. 369-92, Jul 14 2004. ISSN 0166-445X (Print)0166-445X (Linking).

SHAMS, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 283-287, 2015/10/01/ 2015. ISSN 0166-4328.

TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as

mixtures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 9-16, 1// 2011. ISSN 1532-0456.

USEPA. **Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Ammonia Freshwater - EPA 822-R-13-001**. Washington DC: USEPA, 2013. 255.

VANLANDEGHEM, M. M. et al. Spatial and temporal patterns of surface water quality and ichthyotoxicity in urban and rural river basins in Texas. **Water Research**, v. 46, n. 20, p. 6638-6651, 2012.

VUADEN, F. C. et al. Long-Term Methionine Exposure Induces Memory Impairment on Inhibitory Avoidance Task and Alters Acetylcholinesterase Activity and Expression in Zebrafish (*Danio rerio*). **Neurochemical Research**, v. 37, n. 7, p. 1545-1553, 2012/07/01 2012. ISSN 1573-6903.

WICKS, B. J. et al. Swimming and ammonia toxicity in salmonids: the effect of sub lethal ammonia exposure on the swimming performance of coho salmon and the acute toxicity of ammonia in swimming and resting rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 59, n. 1-2, p. 55-69, 2002. ISSN 0166-445X.

WILLIAMS, T. A.; BONHAM, L. A.; BERNIER, N. J. High environmental ammonia exposure has developmental-stage specific and long-term consequences on the cortisol stress response in zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 254, p. 97-106, 2017/12/01/ 2017. ISSN 0016-6480.

WINATA, C. L. et al. The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. **BMC Developmental Biology**, v. 10, 2010.

ZHAO, X. et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, p. 49-59, 7/15/ 2013. ISSN 0166-445X.

ZIMMER, A. M.; NAWATA, C. M.; WOOD, C. M. Physiological and molecular analysis of the interactive effects of feeding and high environmental ammonia on branchial ammonia excretion and Na⁺ uptake in freshwater rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n. 8, p. 1191-1204, 2010/11/01 2010. ISSN 1432-136X.

ZIMMER, A. M.; WRIGHT, P. A.; WOOD, C. M. Ammonia and urea handling by early life stages of fishes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 21, p. 3843, 2017.

III Manuscrito III

A influência da cidade de Caruaru na contaminação e toxicidade das águas superficiais e sedimentos aquáticos do Rio Ipojuca.

Resumo

A cidade de Caruaru no Agreste pernambucano possui uma população de 314.912 habitantes, e é um polo industrial da área têxtil de confecção de roupas, da área fármaco-médico-hospitalar, além do envolvimento direto com o setor terciário no que diz respeito à cultura e festividades. O rio Ipojuca atravessa o centro urbano da cidade de Caruaru, responsável pelo aporte de 42% da carga orgânica doméstica que afluí ao rio Ipojuca, considerado o terceiro rio mais poluído do Brasil. As águas superficiais do Rio Ipojuca a jusante da cidade de Caruaru apresentam elevada toxicidade para o invertebrado de água doce *Daphnia magna*, mas não se sabe com precisão a influência das atividades humanas na área urbana de Caruaru nesta toxicidade, em contraste com a toxicidade oriunda de áreas urbanas e rurais a montante de Caruaru. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico de águas superficiais e dos elutriatos de sedimentos aquáticos a montante (AC), no meio (MC) e a jusante (DC) da cidade de Caruaru, utilizando estágios embriolarvais do peixe *D. rerio* para avaliação da toxicidade letal e subletal com múltiplos biomarcadores. Alterações de parâmetros bioquímicos como acetilcolinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) e marcadores de estresse oxidativo como as espécies reativas de oxigênio (ERO), e catalase (CAT) foram mais frequentes nas larvas expostas as amostras de MS e DC. A toxicidade letal para larvas de *D. rerio* expostas a amostras de água superficial e de elutriatos de sedimentos da estação AC foi menor quando comparada a larvas expostas às estações MC e DC. As malformações, além da não absorção do vitelo foram processos que podem ter acarretado nas reduções do comprimento larval encontrados nos organismos das estações MC e DC. A estação DC apresentou alta toxicidade para os organismos expostos, sendo a água superficial (100%) e a maior diluição (25%) do elutriato 100% letais para os organismos expostos. As larvas sobreviventes apresentaram frequências significativas de patologias, das quais podem ser citadas, atraso no desenvolvimento da boca, ausência de circulação sanguínea e ausência de insuflamento da bexiga natatória, ambas associadas também à exposição ao NH₃, e

estiveram entre as estruturas responsáveis pelo atraso no desenvolvimento embrionário. O mesmo se aplica as concentrações de HPA que foram significativamente maiores à medida que o rio atravessa o centro urbano da cidade.

1. INTRODUÇÃO

A saúde biológica das bacias hidrográficas e seus mananciais estão negativamente correlacionados com a urbanização e o negligenciamento do desenvolvimento antropogênico que gera consequências para os ecossistemas aquáticos (Miltner *et al.*, 2004). Os rios urbanos ou aqueles que possuem boa parte de seu curso dentro de grandes cidades tem índices altíssimos de alterações destes ambientes devido à demanda humana para descarte de seus resíduos (Li e Liu, 2019). Os efluentes descartados nos corpos límnicos em grande parte carregam diferentes classes de contaminantes em misturas complexas com potenciais tóxicos distintos. A biodisponibilização destes contaminantes na coluna d'água ou no sedimento submete os organismos a uma possível exposição crônica a diversos grupos de contaminantes, gerando efeitos adversos em diferentes níveis biológicos.

Dentre os poluentes presentes nos corpos límnicos a amônia e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) estão entre os contaminantes que em parte tem suas concentrações relacionadas a atividades antropogênicas (Mastral e Callén, 2000; Randall e Tsui, 2002). Os efluentes domésticos, assim como os fertilizantes agrícolas e os processos de tratamento industrial contribuem diretamente para o aumento nas concentrações de amônia nestes ecossistemas (Fairchild *et al.*, 2005). Por outro lado os HPA tendem a se adsorver a partículas suspensas na coluna d'água e são posteriormente integrados aos sedimentos, o que a torna uma matriz complexa de poluentes persistentes sujeitos a intemperismo e aumento da toxicidade em certos casos (Incardona *et al.*, 2005; Wölz *et al.*, 2010).

O rio Ipojuca presente no nordeste brasileiro foi considerado o terceiro rio mais poluído do Brasil segundo o índice de desenvolvimento sustentável (IDE) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2013. Ao longo de sua extensão sofre diferentes pressões de variadas atividades antropogênicas, incluindo a indústria sucroalcooleira, pecuária, agroindústria, indústria química, têxtil, metalúrgica, produtos farmacêuticos e veterinários, que juntamente com as pressões decorrentes das áreas urbanizadas reduzem a qualidade de suas águas (CPRH, 2014). Foi verificada contaminação do rio Ipojuca por pesticidas organoclorados (Araujo *et al.*, 1998), metais

pesados (Da Silva *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2019) e foi avaliado mediante as consequências diretas e indiretas da atividade sucroalcooleira (Gunkel *et al.*, 2007). O rio Ipojuca atravessa o centro urbano da cidade de Caruaru, responsável pelo aporte de 42% da carga orgânica doméstica que afluí ao rio Ipojuca. Esta característica garantiu à estação de coleta a jusante da cidade Caruaru com o título de estação mais poluída ao longo do rio, já sendo detectada toxicidade para o modelo invertebrado *Daphnia magna* no ano de 2018 (CPRH, 2020).

A utilização de peixes para avaliação de contaminação química e monitoramento de ecossistemas aquáticos é importante devido seu valor ecológico e por representar metade da biodiversidade de vertebrados (Di Giulio e Hinton, 2008; Roméo e Giambérini, 2013). O peixe teleósteano de água doce “zebrafish” *Danio rerio* é hoje um dos principais modelos biológicos de vertebrados, sendo utilizado para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento e avaliação de parâmetros ecotoxicológicos em laboratório a nível letal e subletal, incluindo biomarcadores morfológicos e comportamentais (Embry *et al.*, 2010). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da cidade de Caruaru na contaminação e toxicidade das águas superficiais e dos sedimentos aquáticos do rio Ipojuca, utilizando *D. rerio* para avaliação de efeitos letais e subletais através de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica.

2. METODOLOGIA

2.1. CULTIVO DOS ORGANISMOS E EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL E DILUIÇÕES DO ELUTRIATO

Peixes adultos cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX/UFPE) da espécie *Danio rerio* foram mantidos em aquários de 100 L, e os padrões de qualidade da água de cultivo mantiveram-se constantes, com a concentração da amônia total abaixo $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, pH entre 6,5 e 7,5, oxigênio dissolvido $6,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (média \pm desvio padrão) temperatura $28 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (média \pm desvio padrão). A alimentação diária dos adultos reprodutores ocorreu quatro vezes ao dia com ração com 40% de proteína de peixe e náuplios recém-eclodidos vivos de *Artemia salina*.

Para a obtenção dos ovos fertilizados, três fêmeas maduras e seis machos foram transferidos para um aquário de desova (15 L de volume) na tarde do dia anterior ao início do experimento. Após a desova e fertilização ao amanhecer, foi realizada uma

triagem e seleção de ovos fertilizados e viáveis por observação direta em um estereomicroscópio Zeiss ® com 50 X de magnificação. A taxa de fertilização foi superior a 90%. O sistema de exposição seguiu as normas da OECD 236 (OECD, 2013), e os ovos viáveis foram dispostos em placas de cultivo de células com 24 poços, 20 indivíduos expostos em uma placa para cada diluição do elutriato e para as amostras de água superficial, sendo quatro indivíduos mantidos como controles internos. O volume da amostra de cada tratamento adicionado em cada poço foi de 2,5 mL, sendo que 2 mL foram substituídos a cada 24 h. As amostras foram aeradas antes da troca de 2,5 mL visando manter os níveis de oxigênio dissolvido acima de 5 mg L⁻¹, visto que em alguns pontos os níveis de oxigênio dissolvido eram menores que esse valor, de forma a assegurar que qualquer efeito tóxico não estivesse relacionado a baixas concentrações de O₂ dissolvido.

2.2. COLETA DE ÁGUAS SUPERFICIAIS E PRODUÇÃO DO ELUTRIATO

As amostras de sedimento e água foram coletadas no mesmo dia em 3 locais, um deles a montante da cidade de Caruaru (AC), outro no meio do centro urbano (MC) e o último a jusante do centro urbano da cidade (DC) (Figura 1). As amostras de água superficial foram coletadas com balde de plástico, e armazenadas em frascos âmbar com um volume de 1 L. As amostras de sedimento foram coletadas com uma draga de aço inox tipo Vanveen. Em seguida as amostras de água superficial foram transportadas para o laboratório onde foram armazenadas e refrigeradas a 4°C por no máximo 7 dias até o início dos testes ecotoxicológicos. A amostra de sedimento foi armazenada em potes de vidro a -20 °C.

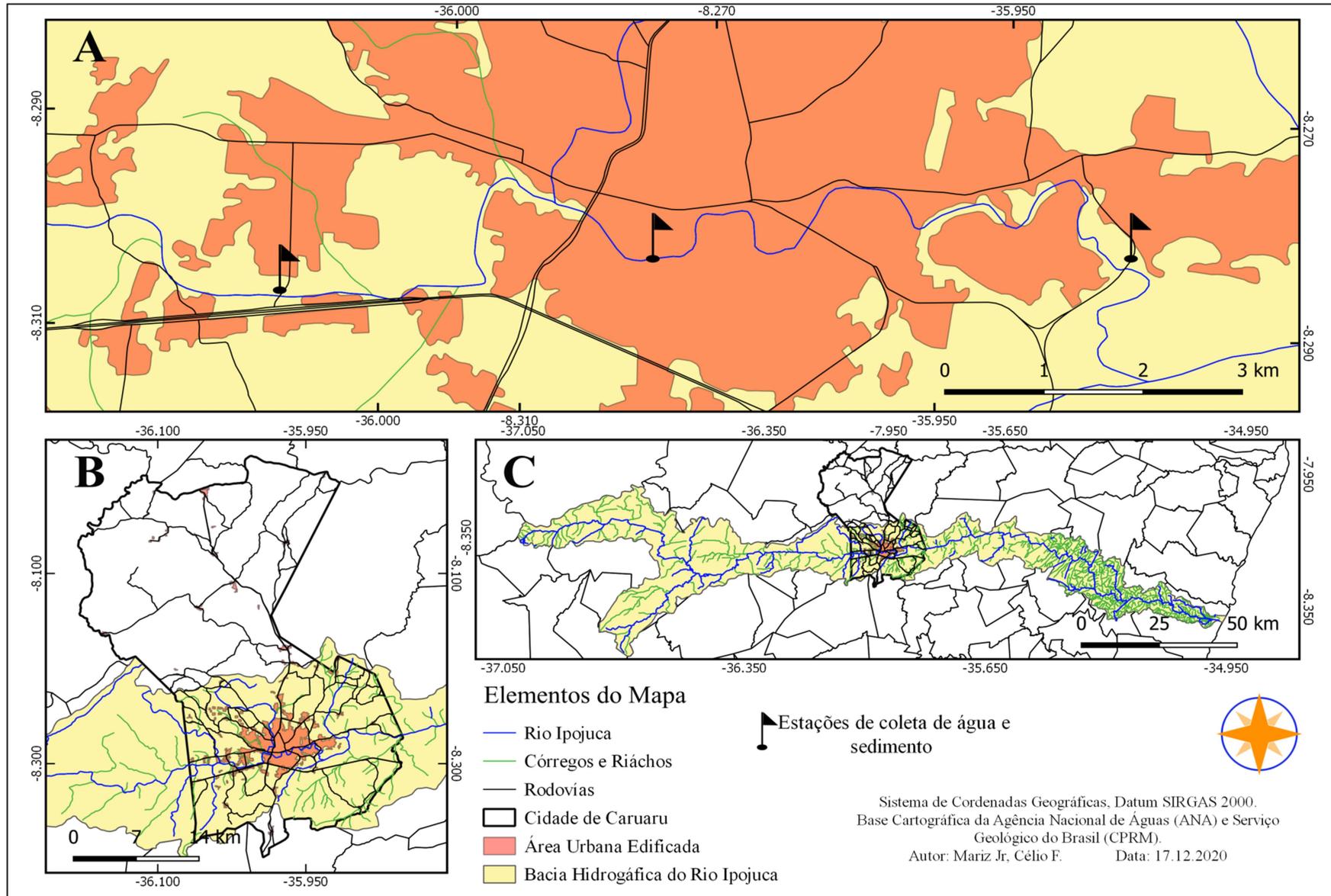
O elutriato foi produzido em uma proporção de 1:4 (m/v) das amostras de sedimento do leito do rio e água de cultivo de *Danio rerio* esterilizada por luz ultravioleta. O pH foi quantificado em campo utilizando uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus e os mesmos valores foram utilizados para a água de diluição do elutriato (Tabela 1), visto que a amônia é dependente de fatores como pH e temperatura. A amostra foi agitada por 24 h no escuro dentro de uma capela e deixada mais 24h para decantação no escuro em temperatura ambiente. Após este procedimento foi realizada uma filtração com filtro de 2 µm a fim de remover qualquer partícula de solo. O homogenato bruto foi utilizado para a produção das soluções de trabalho com 25%, 12,5%, 8,75%, 6,25%, 3,13% e 1,56%. As soluções foram armazenadas em garrafas âmbar a 4°C durante o período de uso. No momento do uso as amostras foram

novamente aclimatadas a temperatura ambiente naturalmente e aeradas a fins de restabelecimento da oxigenação em torno de 5 mg L⁻¹.

Tabela 1. Quantificação de amônia nas amostras de água e na diluição 25% das amostras de elutriato.

Matriz	Estação	NH ₄ mg L ⁻¹	NH ₃ mg L ⁻¹	pH	Temperatura de exposição °C
Água	AC	0,971	0,067	7,63	27,9 ± 0,01
	MC	0,985	0,087	7,35	27,9 ± 0,01
	DC	0,988	0,117	7,22	27,9 ± 0,01
Sedimento	AC 25%	0,66	0,018	7,63	27,9 ± 0,01
	MC 25%	1,153	0,166	7,35	27,9 ± 0,01
	DC 25%	4,274	0,136	7,22	27,9 ± 0,01

Figura 1. Estações de coleta de água superficial e sedimento na cidade de Caruaru. Mapa A: centro urbanizado da cidade destacado as estações de coleta no sentido leste oeste (curso do rio) AC, MD e DC, B: Mapa da cidade de Caruaru com seu centro urbano inserido dentro da bacia hidrográfica do rio Ipojuca e C: Bacia Hidrográfica do Rio Ipojuca no estado de Pernambuco – Brasil.



2.2. QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIA E HPA DAS AMOSTRAS.

2.2.1 Quantificação das concentrações de amônia nas amostras de água e diluições de elutriato

A concentração real de amônia total na água foi quantificada pelo método colorimétrico do indofenol (Koroleff, 1976) em um espectrofluorímetro (SpectraMax M3, EUA) usando o comprimento de onda 673 nm para absorbância. A estimativa das concentrações foi realizada através de uma curva analítica com oito concentrações de 0 a 6 mg amônia total L⁻¹ ($R^2 = 0,996$), segundo a equação:

$$\text{Amônia total} = 0,0005 * \text{Absorbância} + 0,0885 \quad (R^2 = 0,996).$$

As concentrações de NH₃ foram calculadas utilizando os cálculos para especiação propostos por (Emerson *et al.*, 1975) para um pH = 8,41 e pK = 9,15 (temperatura de 28 °C) (Tabela 1)

2.2.2. Quantificação das concentrações de HPA nas amostras de águas superficiais

As amostras foram processadas no Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR/UFPE) no departamento de Oceanografia do Centro de Tecnologia e Geociências (CTG). As amostras de água foram extraídas líquido-líquido adaptado de (Lemos *et al.*, 2014) e (Arruda-Santos *et al.*, 2018). Em resumo, 20 mL de n-hexano (grau de pesticida) foram adicionados à garrafa de vidro âmbar de 1L imediatamente após a amostragem de água. O frasco foi agitado vigorosamente por 5 min para extrair HPA solúveis em hexano. No laboratório, antes de extrair a fase orgânica, 100 µL de uma solução de HPA deuterado (acenaftene-d10, fenantreno-d10 e criseno-d12, a 1000 ng mL⁻¹) foram adicionados como padrão interno em todas as amostras. Na₂SO₄ anidro (previamente aquecido a 450 °C) foi adicionado ao extrato para traços de ligação de água. Os extratos foram concentrados a 1 mL em um evaporador rotativo e os HPA foram analisados em um cromatógrafo gasoso (CG-Agilent Technologies, modelo 7820) acoplado a espectrometria de massa (MS-Agilent Technologies, modelo 5975C) no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM), enquanto a fonte de ionização de elétrons MS foi operada a 70 eV. O CG foi equipado com uma coluna capilar HP-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e as injeções (1 µL) foram realizadas sob fluxo constante. As temperaturas do injetor CG e da linha de transferência MS foram estabelecidas em 300 °C. A temperatura do equipamento foi programada da seguinte forma: a 60 °C, taxa de 15 °C min⁻¹ a 150 °C, taxa de 5 °C min⁻¹ a 220 °C e taxa de 10 °C min⁻¹ a 300 °C, com uma retenção final de 10 min. Os

16 HPA prioritários listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) foram identificados (Tabela 2)

Tabela 2. Quantificação de HPA nas amostras de água superficial no trecho do rio Ipojuca que passa pela cidade de Caruaru.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) Água superficial			
	AC	MC	DC
Concentração	ng L ⁻¹	ng L ⁻¹	ng L ⁻¹
Analito de Interesse			
Naftaleno	7,81	114,58	135,48
2-Metil Naftaleno	1,53	18,25	16,99
Acenaftileno	ND	<LQ	<LQ
Acenafteno	ND	1,59	2,98
Fluoreno	ND	13,01	16,16
Fenantreno	140,09	169,49	412,32
Antraceno	1,19	3,68	6,31
Fluoranteno	1,14	12,0	1,26
Pireno	3,43	27,73	114,17
Benzo[a]antraceno	ND	2,17	5,93
Criseno	<LQ	4,4	11,85
Benzo[b]fluoranteno	ND	ND	2,01
Benzo[k]fluoranteno	ND	ND	7,77
Benzo[a]pireno	ND	ND	3,15
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	56,71	33,58
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	ND
Benzo[ghi]perileno	ND	ND	2,79
Somatório de HPA totais	155,19	423,61	772,74

2.4. TAXAS DE LETALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

A letalidade foi computada seguindo as normas da OECD 236 (Oecd, 2013). Foram computados como letalidade os seguintes parâmetros: coagulação, ausência de somitos 24 horas pós-fertilização (hpf), ausência de batimentos cardíacos ao final de 48 hpf e ausência do destacamento da cauda em 48 hpf.

2.5. ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO

Ao longo do período de exposição de 96 h, foi quantificado para cada larva o índice de desenvolvimento morfológico (*General Morphology Score* – GMS)(Beekhuijzen *et al.*, 2015). O GMS se baseia na atribuição de pontos ao embrião/ larva observada durante seu

desenvolvimento conforme estruturas morfológicas importantes são formados entre 0 e 96 hpf. Cada embrião/ larva de cada tratamento foi avaliada para presença destas características em estereomicroscópio Zeiss® com aumento entre 5 X e 80 X, entre 0 e 96 hpf. Ao final das 96 h de exposição uma larva perfeita apresenta um GMS igual a 17. Neste trabalho o marco morfológico insuflamento da bexiga natatória não previsto por (Beekhuijzen *et al.*, 2015) também foi avaliado em 96 hpf, e portanto o valor máximo do GMS para uma larva perfeita foi igual a 18 pontos. A redução dos valores do GMS indica atrasos no desenvolvimento embriolarval.

2.6. FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO

A frequência das seguintes patologias ou anomalias morfológicas foi computada para cada grupo de 20 larvas expostas às amostras de água superficial a partir da fertilização dos ovos. Após 24h da fertilização 24 hpf: % de larvas com ausência de circulação e com circulação lenta, % de larvas sem movimento, % de organismos com cauda não desenvolvida 48h após a fertilização 48 hpf: % de eclosão prematura, 72 hpf: % de larvas com ausência de nadadeira peitoral, % ausência de pigmentação, % atrasos no desenvolvimento do aparato mandibular, 96 hpf: % de larvas com edema, % de larvas com déficit na absorção do saco vitelínico, % de larvas sem bexiga natatória insuflada, % larvas com eclosão atrasada.

2.7. FREQUÊNCIA CARDÍACA

A frequência cardíaca foi quantificada nas larvas em 48 e 72 hpf. O organismo já está com o coração formado possibilitando a observação. As observações são feitas em microscópio invertido DIGILAB® utilizando um aumento de 20 X. A quantificação foi realizada pela contagem do número de contrações ventriculares em um período de 30 segundos com o auxílio de um cronômetro, em um total de 10 indivíduos para cada diluição das amostras de elutriato.

2.8. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA

As larvas sobreviventes em 168 hpf foram transferidas individualmente para poços de placas de cultivo de células de 12 poços com 3 mL de água limpa. Cada larva foi filmada durante 5 minutos (300 s) em visão superior usando câmeras de vídeo (modelo VP600H, Intellbras®, São José, Brasil) com lentes de zoom variável de 6-60 mm, e os vídeos gravados em computador através de placa de captura Geovision® modelo GV900A. A velocidade média de natação (cm s^{-1}) realizada pelas larvas durante o período monitorado foi calculada pelo software de rastreamento Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking – Smart® (PanLabs, Harvard Apparatus, EUA).

2.9. MEDIDA MORFOMÉTRICA

Ao final dos testes comportamentais para avaliação de velocidade natatória, as larvas foram fotografadas com uma câmera Cannon® PowerShot G10 acoplada em lupa Zeiss® Stemi 2000 C, utilizando aumento de 20 X. O comprimento total larval foi medido com uma precisão de 0,1 mm com o software AxioVision (Zeiss®)

2.5. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

2.5.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A quantificação da atividade da acetilcolinesterase foi adaptado para microplacas a partir de do método de (Ellman *et al.*, 1961). Para cada réplica amostral, pools de 4 larvas 96 hpf expostos a água limpa ou os demais tratamentos foram homogeneizados em 100 μ L de tampão fosfato de potássio (KPI 0,25 M com pH 7,4) refrigerado e mantido sob gelo, seguido de centrifugação por 4 min em centrífuga refrigerada a 4 °C a 3000g. O princípio da atividade se baseia na quantificação da cor amarelada produzida pela tiocolina quando reage com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB), formando o TNB quantificado por absorvância no espectro fluorímetro, SpectraMax® M3 utilizando um comprimento de onda de 415 nm. O cálculo foi baseado no coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a AChE expressa em nmol de TNB $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

2.5.2. Glutathione - S - Transferase (GST)

O método para leitura da atividade da GST foi adaptado pra microplaca a partir do método de (Habig *et al.*, 1974). As réplicas e processo de homogeneização foi o mesmo utilizado para a quantificação da AChE. A atividade da GST foi determinada a partir da conjugação da glutathione (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado a 340 nm no espectro fluorímetro, SpectraMax® M. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a GST expressa em nmol de CDBN $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

2.5.3. Glutathione (GSH)

O método para a quantificação do GSH foi adaptado pra microplaca seguindo o método de (Beutler *et al.*, 1963). O homogenato foi constituído por 40 embriões com 96 hpf em 100 μ L de tampão e centrifugada por 15 min, 4 °C a 12000g. No entanto parte da amostra foi homogeneizada na proporção 1:2 total com ácido tricloroacético (TCA 6%) e depois centrifugada a 4000 rpm a 4 °C por 5 min. Após a centrifugação o homogenato foi lido junto o DTNB. A quantificação de GSH foi determinada a partir da conjugação da glutathione (GSH) com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB) 2,2 mM, formando o tiolato (TNB) que é detectado a 412

nm no espectro fluorímetro, SpectraMax® M3 as concentrações foram dadas em $\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$.

2.5.4. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O método utilizado para a leitura das ERO (Zhao *et al.*, 2013) foi quantificado utilizando diacetato 2,7-Diclorofluorescina (DCF-DA). Para cada réplica amostral, pools de 20 larvas 96 hpf expostos a água limpa ou as diluições do elutriato foram homogeneizadas com 100 μL de tampão fosfato de sódio (PBS pH 7,4) e centrifugadas por 30 min, 4 °C a 12000 g. Em uma placa de 96 poços foi inserido 20 μL de amostra, 200 μL de tampão fosfato salino PBS pH 7,4 e 8,3 μL de DCF-DA 1 mg mL^{-1} posteriormente a placa foi incubada por 30 min a 37 °C. Após o período de incubação foi lida a fluorescência com a excitação em 485 nm e a emissão em 520 nm, e a ERO expressa em (%) unidade de fluorescência Relativa (UFR) % do controle mg proteína^{-1} .

2.5.5. Supeóxido Dismutase (SOD)

A leitura de atividade da enzima SOD foi estabelecido por (Marklund e Marklund, 1974) e adaptado por (Maharajan *et al.*, 2018) se baseia na inibição da autooxidação do pirogalol. O homogenato utilizado foi o mesmo empregado para quantificação do GSH. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 140 μL de tampão (tris-HCl 0,05 M pH 8,5 EDTA 1 mM), 52,5 μL de amostra, 52,5 μL de água e foi realizada uma leitura basal 420 nm. Após a leitura basal foi adicionado 35 μL de solução de pirogalol 6 mM em 0,05 M de HCl. A atividade da enzima foi dada em U SOD min^{-1} mg proteína^{-1} .

2.5.6. Catalase (CAT)

A catalase (CAT) foi caracterizada pela leitura do consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seguindo o método de (Beers e Sizer, 1952) adaptado para microplacas por (Li e Schellhorn, 2007). O homogenato utilizado foi o mesmo empregado para quantificação do GSH. A reação foi quantificada por leitura de absorbância a 240 nm. A atividade foi calculada mediante coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de decomposição de consumo do peróxido de hidrogênio, e a CAT expressa em $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ mg proteína^{-1} .

2.5.7. Peroxidação lipídica (POL)

Os marcadores de danos oxidativos são medidos mediante conjugação do melondialdeído (MDA) com o ácido tio barbitúrico (TBARS). O homogenato foi o mesmo utilizado no teste ROS. A leitura do MDA foi realizada em microplacas de 96 poços preta. No poço foram inseridos 160 μL de PBS, 10 μL de hidroxitolueno butilado 95% dissolvido em etanol 95% (BHT), 20 μL da amostra em duplicata, 50 μL de ácido tricloroacético 50% e foi

realizado uma leitura basal no espectro fluorímetro, SpectraMax® M3. Após a leitura basal foi adicionado o ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% e levado à estufa a 60 °C por 1 h. A leitura foi refeita no espectro com excitação de 535 e emissão de 590. Os valores de fluorescência obtidos são aplicados à curva de concentração do MDA ($R^2 > 0,99$).

2.5.8. Quantificação de Proteína

A quantificação das proteínas totais em cada amostra utilizada nos ensaios enzimáticos foi realizada pelo método de (Bradford, 1976). A leitura de absorvância foi realizada utilizando 595 nm e 450 nm. A razão entre os valores obtidos em ambos os comprimentos de onda são aplicados em uma curva analítica expressando a relação entre as razões de absorvância (eixo X) e as concentrações de albumina bovina (BSA $\geq 96\%$ pureza, Sigma Aldrich), ($R^2 > 0,99$).

2.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As taxas de mortalidade e as frequências de patologias das larvas coletadas no diferentes pontos foram comparadas com os controles mediante teste-t para proporções utilizando o software Statistic Calculator (StatPac, Northfield, USA). Os parâmetros das análises bioquímicas, do GMS, frequência cardíaca, comprimento e velocidade natatória foram analisadas mediante comparação com seus respectivos controles por análise de variância (ANOVA), quando verificada normalidade dos dados e homoscedasticidade, ou Kruskal-Wallis, seguida de testes de comparação múltipla de Dunnett e Dunn, respectivamente. Foi utilizado o software Sigmaplot 12 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha).

3. RESULTADOS

3.1 CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E HPA

As concentrações de amônia nas amostras de água superficial foram iguais a 0,067, 0,087 e 0,117 mg NH₃ L⁻¹ em AC, MC e DC, respectivamente. As concentrações de amônia nas amostras das diluições do elutriato de sedimento 25% de AC, MC e DC foram iguais a 0,018, 0,166 e 0,136 mg NH₃ L⁻¹ em AC, MC e DC, respectivamente (Tabela 1).

As concentrações de HPA totais nas amostras de água superficial para AC, MC e DC foram 155,19, 423,61 e 772,74 ng L⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

3.2. TAXAS DE MORTALIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

As taxas de mortalidade das larvas expostas às amostras de água superficial de AC, MC e DC foram iguais a 83%, 79% e 100%, sendo todas significativamente diferentes dos controles. As taxas de mortalidade das larvas expostas às diluições do elutriato de sedimento 25% de AC, MC e DC foram iguais a 0%, 0% e 100%, sendo que a taxa em DC foi significativamente diferente dos controles (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de mortalidade por tratamento ao final de 96h de exposição às diluições do elutriato e água superficial do trecho do rio Ipojuca que passa pela cidade de Caruaru

Diluição	Estações de Coleta						
	AC	p=	MC	p=	DC	p=	
Sedimento	C	0%		0%		0%	
	1,56%	0%	-	5%	0,1234	0%	-
	3,13%	0%	-	0%	-	5%	0,1234
	6,25%	5%	0,1234	0%	-	5%	0,1234
	8,75%	0%	-	0%	-	10%*	0,0296
	12,5%	0%	-	0%	-	90%*	< 0,0001
	25,0%	0%	-	0%	-	100%*	< 0,0001
Água	C	17%					
	100%	83%*	< 0,0001	79%*	< 0,0001	100%*	< 0,0001

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$.

3.3. ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO

Os organismos expostos às amostras de água superficial apresentaram atraso significativo no seu desenvolvimento embrionário nos tratamentos AC e MC quando comparados ao controle, quantificado por decréscimo no índice GMS (Figura 2A). Os embriões expostos à água superficial da estação DC não sobreviveram até as 96 h de experimento (Tabela 3). Não houve atraso significativo no desenvolvimento embrionário do *D. rerio* durante as 96h de exposição aos elutriatos nas diluições variando de 25% a 1,56% da estação AC quando comparados ao controle (Figura 2B). Foi verificado decréscimo no GMS nas larvas expostas aos elutriatos da estação MC nas diluições 6,25%, 12,5% e 25% (Figura 2B). Foi verificado decréscimo no GMS nas larvas expostas aos elutriatos da estação DC nas diluições 6,25%, 8,75% e 12,5% (Figura 2B). As larvas da diluição 25% dos elutriatos da estação DC não sobreviveram até as 96 h de experimento.

Figura 2. Índice de desenvolvimento morfológico (mediana e quartis) de larvas de *Danio rerio* expostas à água superficial e diluições de elutriato das diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru. Painéis

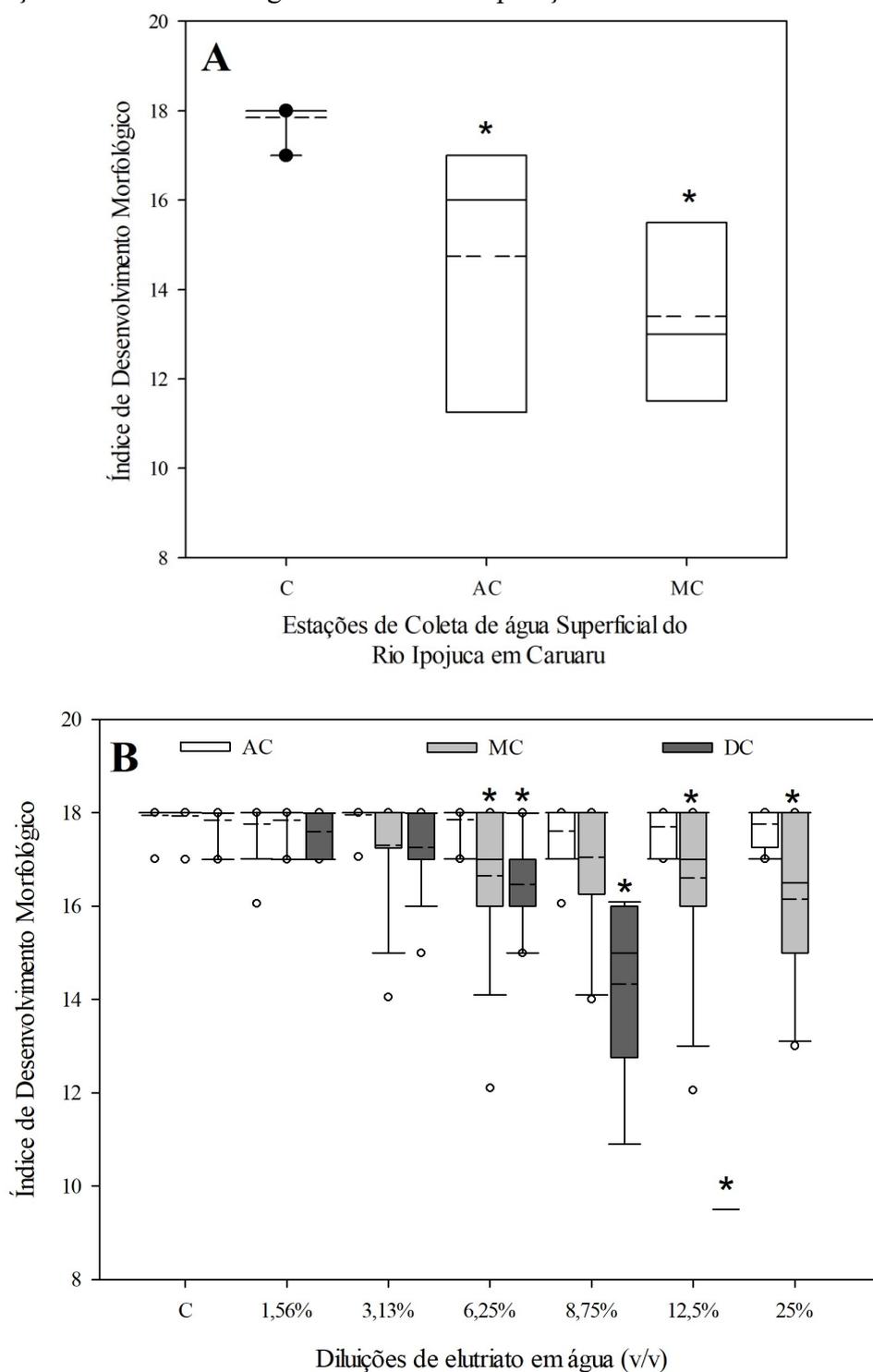
A: (Kruskal-Wallis, $H = 20,72$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$)

B (Kruskal-Wallis, $H = 13,822$ $p = 0,032$, Dunn $p < 0,05$);

(Kruskal-Wallis, $H = 44,515$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$);

(Kruskal-Wallis, $H = 75,452$ $p \leq 0,001$, Dunn $p < 0,05$).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.4. FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NO DESENVOLVIMENTO

Na matriz água superficial as estações MC e DC induziram as maiores frequências de anormalidade para os organismos testados. Frequências significativas de larvas apresentaram ausência de circulação sanguínea e edema perivitelínico nas larvas expostas à água superficial da estação DC 58,% e 37,5%, respectivamente. Na estação MC as larvas que foram expostas apresentaram frequências significativas de ausência de pigmentação e não destacamento da cauda 70,8% e 33,3%, respectivamente (Tabela 4 A e B).

As maiores frequências patológicas encontradas para os organismos expostos as diluições de AC foram ausência de circulação sanguínea, ausência de pigmentação (Figura 3E) e edema no vitelo (Figura 3K), correspondendo a 25%, 100% e 20% todas na diluição 25%. Nas larvas expostas às diluições de MC foram mais frequentes as patologias vitelo não absorvido, atraso na eclosão e bexiga não insuflada (Figura 3K), correspondendo a 45%, 45% e 30%, respectivamente no tratamento 25%. Nas diluições de DC foram mais frequentes as patologias desenvolvimento embrionário interrompido (Figura 3B), atraso no desenvolvimento da boca (figura 3F) e não insuflamento da bexiga natatória, correspondendo a 100%, 40% e 85%, respectivamente, nas seguintes diluições 25% e 8,75% (Tabela 4A e B).

Figura 3. Principais patologias encontradas até 96 hpf em embriões e larvas de *Danio rerio*. A-Embrião com 24hpf em seu pleno desenvolvimento; B- Ovo fecundado e com desenvolvimento interrompido próximo a 24 hpf; C- Embrião com 48 hpf e a seta evidenciando uma hemorragia no vitelo (He); D- Embrião com 48 hpf em pleno desenvolvimento e com pigmentação normal; E- Embrião com total ausência de pigmento na cabeça, corpo e olho com 48 hpf; F- Larva 72 hpf com estrutura mandibular da boca protrusível anormal (BP); G- Larva com 72 hpf com a estrutura mandibular normal para o tempo de desenvolvimento; H- Boca normal para 96 hpf; I- Edema Pericárdico (EPC); J- Larva 96 hpf com desenvolvimento normal, exibindo uma coluna ereta e bexiga natatória bem evidente (BN); K- Larva com 96 hpf evidenciando um edema Perivitelínico (EPV), bexiga natatória ausente (BN) e coluna curvada com escoliose evidenciada pela reta angular vermelha.

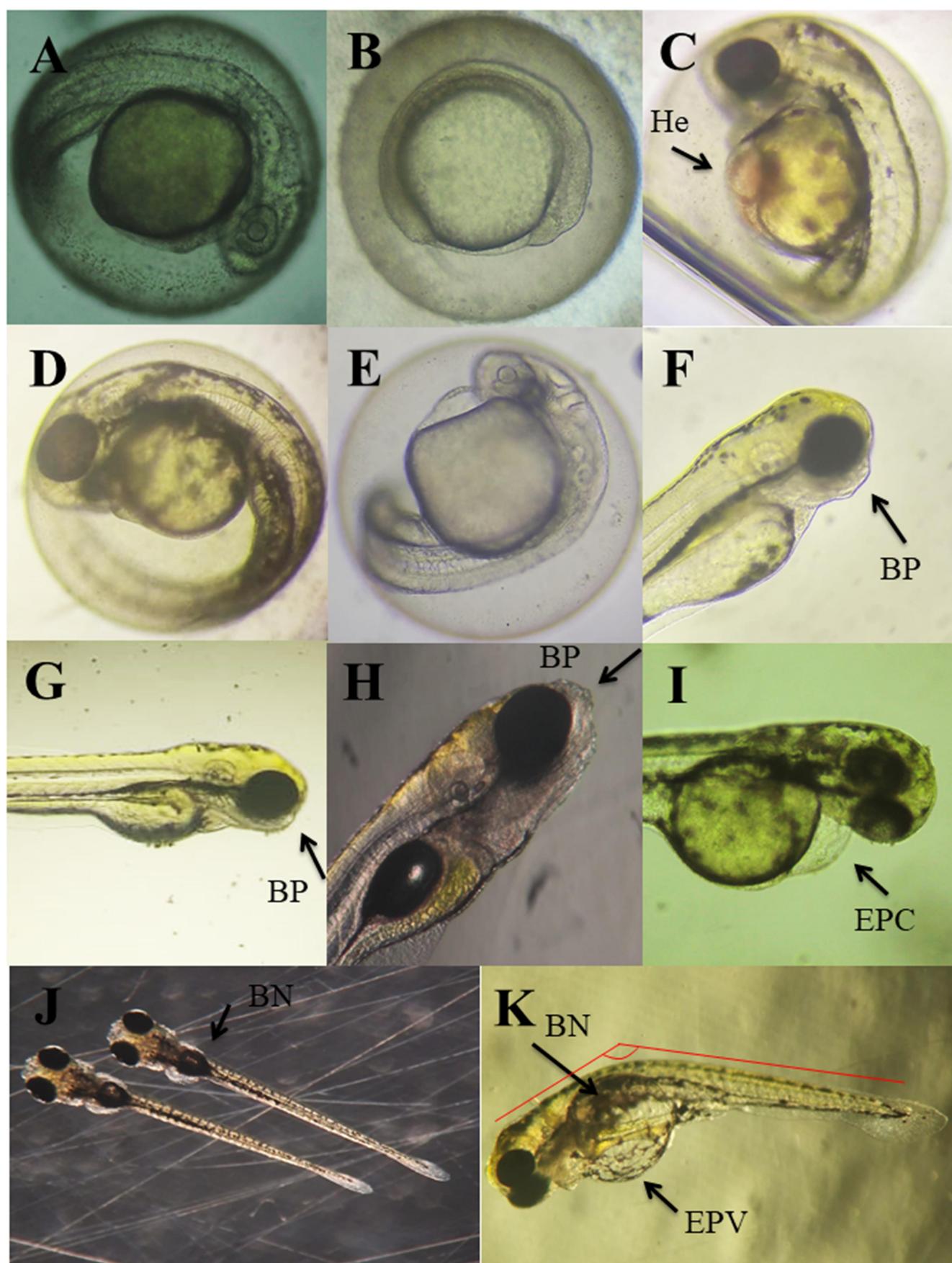


Tabela 4A. Frequência (%) de patologias em larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição às águas superficiais e elutriato do sedimento do rio Ipojuca no trecho que passa pela cidade de Caruaru.

Matriz	Estação de Coleta	Diluições	Circulação Ausente ou Lenta (24 hpf)	Ausência de Nadadeira Peitoral (96 hpf)	Ausência de Movimento (24 hpf)	Desenvolvimento da Cauda (24 hpf)	Hemorragia (96 hpf)	Malformações da Notocorda (96 hpf)	Ausência de Pigmentações (48 hpf)	
Água	AC MC DC	C	4,17%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
		100%	8,34%	0,0%	0,0%	4,67%	4,17%	12,5%	8,33%	
		100%	8,34%	20,08%*	0,0%	33,3%*	0,0%	20,8%*	70,8%*	
	Antes do Centro Urbano de Caruaru-AC	DC	100%	58,3%*	-	4,17%	0,0%	0,0%	4,17%	33,3%*
			C	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			1,56%	10,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	35,0%*
			3,13%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	45,0%*
			6,25%	10,05%*	0,0%	0,0%	0,0%	5,26%	0,0%	100%*
			8,75%	15,0%*	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	75,0%*
			12,5%	20,0%*	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100%*
25,0%	25,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100%*			
Elutriato	No Meio do Centro Urbano de Caruaru-MC	C	2,27%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
		1,56%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
		3,13%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%*	0,0%	10,0%*	
		6,25%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%*	
		8,75%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%*	
		12,5%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	15,0%*	
		25,0%	10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	15,0%*	
	Depois do Centro Urbano de Caruaru-DC	DC	C	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			1,56%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%*
			3,13%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%*
6,25%			5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%*	
		8,75%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	25,0%*	
		12,5%	10,0%*	10,0%*	15,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%*	
		25,0%	-	-	-	-	-	-	-	

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$

Tabela 4B. Frequência (%) de patologias em larvas de *Danio rerio* após 96h de exposição às águas superficiais e elutriato do sedimento do rio Ipojuca no trecho que passa pela cidade de Caruaru.

Matriz	Estação de Coleta	Diluições	Eclosão Prematura (48 hpf)	Eclosão Atrasada (96 hpf)	Atraso no Desenvolvimento da Boca (72 96 hpf)	Edema no Saco Vitelínico (96 hpf)	Edema Pericárdico (96 hpf)	Desenvolvimento Embrionário Interrompido (24 hpf)	Bexiga Natatória não Insuflada (96 hpf)	Vitelo não Absorvido (96 hpf)	
Água	AC MC DC	C	4,17%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4,17%	0,0%	
		100%	0,0%	8,33%	12,5%	4,17%	12,5%	0,0%	16,67%	16,67%*	
		100%	0,0%	12,5%	25,0%*	16,6%*	0,0%	25,0%*	20,83%	20,83%*	
	Antes do Centro Urbano de Caruaru-AC	C	100%	8,33%	-	-	37,5%*	0,0%	0,0%	-	-
			C	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4,54%	2,27%
			1,56%	5,0%	0,0%	0,0%	15,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			3,13%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			6,25%	0,0%	0,0%	0,0%	10,5%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			8,75%	5,0%	5,0%	5,0%	10,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
			12,5%	5,0%	0,0%	0,0%	10,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
No Meio do Centro Urbano de Caruaru-MC	C	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
		C	2,27%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,27%	2,27%	
		1,56%	5,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	
		3,13%	0,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	0,0%	10,0%	15,0%*	
		6,25%	10,0%	35,0%*	10,0%*	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	30,0%*	
		8,75%	5,0%	15,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	25,0%*	
		12,5%	0,0%	25,0%*	5,0%	5,0%	0,0%	0,0%	25,0%*	30,0%*	
Depois do Centro Urbano de Caruaru-DC	C	25,0%	0,0%	45,0%*	20,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	30,0%*	45,0%*	
		C	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,82%	2,27%	
		1,56%	35,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
		3,13%	10,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%	15,0%	0,0%	
		6,25%	15,0%*	0,0%	10,0%*	5,0%	0,0%	0,0%	45,0%*	55,0%*	
		8,75%	5,0%	0,0%	40,0%*	0,0%	10,0%	0,0%	85,0%*	90,0%*	
		12,5%	10,0%*	10,0%*	10,0%*	10,0%*	10,0%	35,0%*	10,0%	10,0%	
25,0%	-	-	-	-	-	100%*	-	-			

*: Diferença significativa baseada em um teste-t para proporção de duas amostras, $p < 0,05$.

3.5. FREQUÊNCIA CARDÍACA

As contrações ventriculares após 48 h foram estatisticamente menores que o controle no tratamento 25% do elutriato da estação AC (Figura 4A). As frequências cardíacas dos embriões nos tratamentos 8,75%, 12,5% e 25% da estação MC após 48 h foram estatisticamente mais aceleradas quando comparadas ao controle (Figura 4A). Já os embriões expostos às diluições da estação DC após 48 h apresentaram redução estatística da frequência cardíaca em 3,13%, 6,25%, 8,75% e 12,5% quando comparados ao controle (Figura 4A).

Após 72 h de experimento as larvas expostas às diluições 1,56%, 3,13% e 6,25% da estação AC apresentaram redução estatística da frequência cardíaca, enquanto que as larvas dos tratamentos 12,5% e 25% apresentaram aumento estatístico da frequência cardíaca (Figura 4B). As larvas dos tratamentos da estação MC não apresentarão diferença estatística na frequência cardíaca após 72 h de exposição (Figura 4B). As larvas expostas às diluições da estação DC apresentaram redução estatística da frequência cardíaca em todos os tratamentos quando comparados ao controle (Figura 4B).

Figura 4. Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n= 10) expostas à água superficial das diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru.

A: contrações ventriculares em 48 hpf

AC: (ANOVA, $F = 2,44$ $p = 0,033$, Dunnett $p < 0,05$),

MC: (ANOVA, $F = 3,595$ $p = 0,004$, Dunnett $p < 0,05$)

DC: (ANOVA, $F = 89,613$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$);

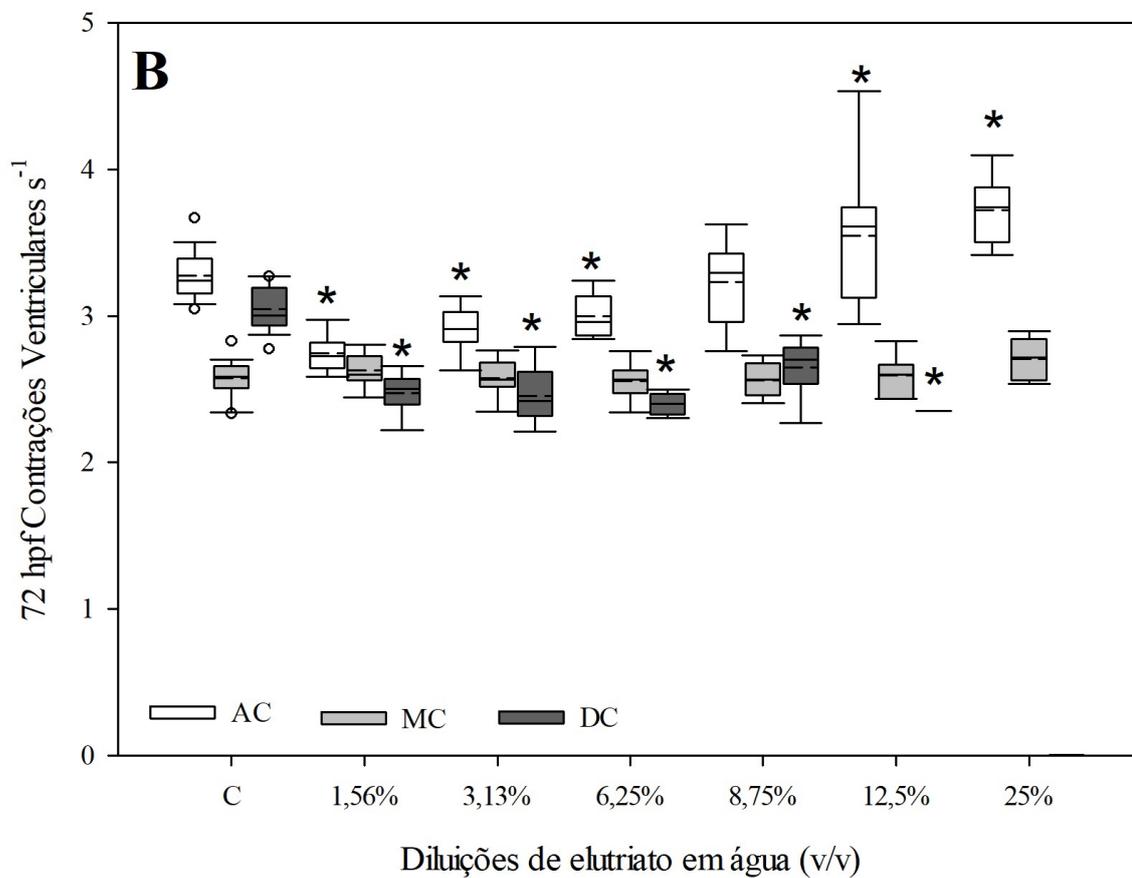
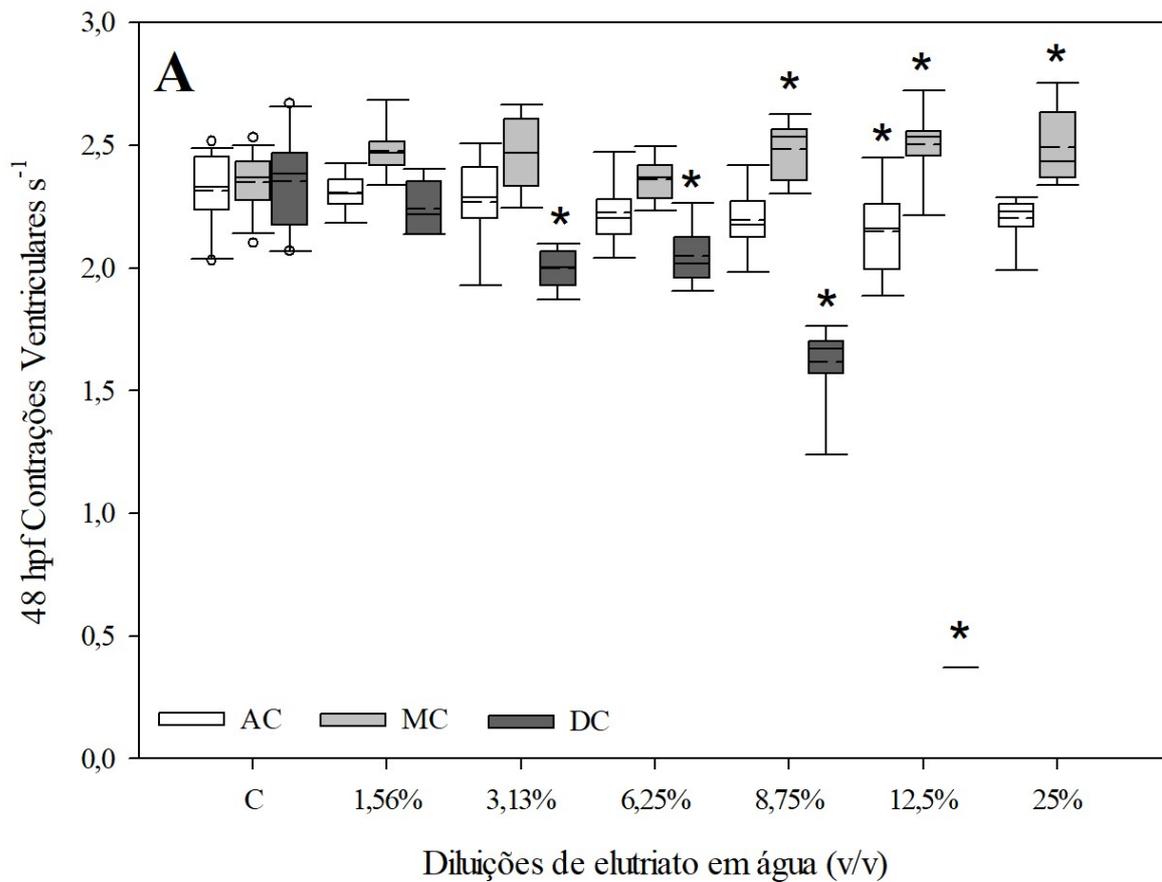
B: contrações ventriculares em 72 hpf

AC: (ANOVA, $F = 20,692$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$),

MC: (ANOVA, $F = 1,837$ $p = 0,104$)

DC: (ANOVA, $F = 31,475$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).

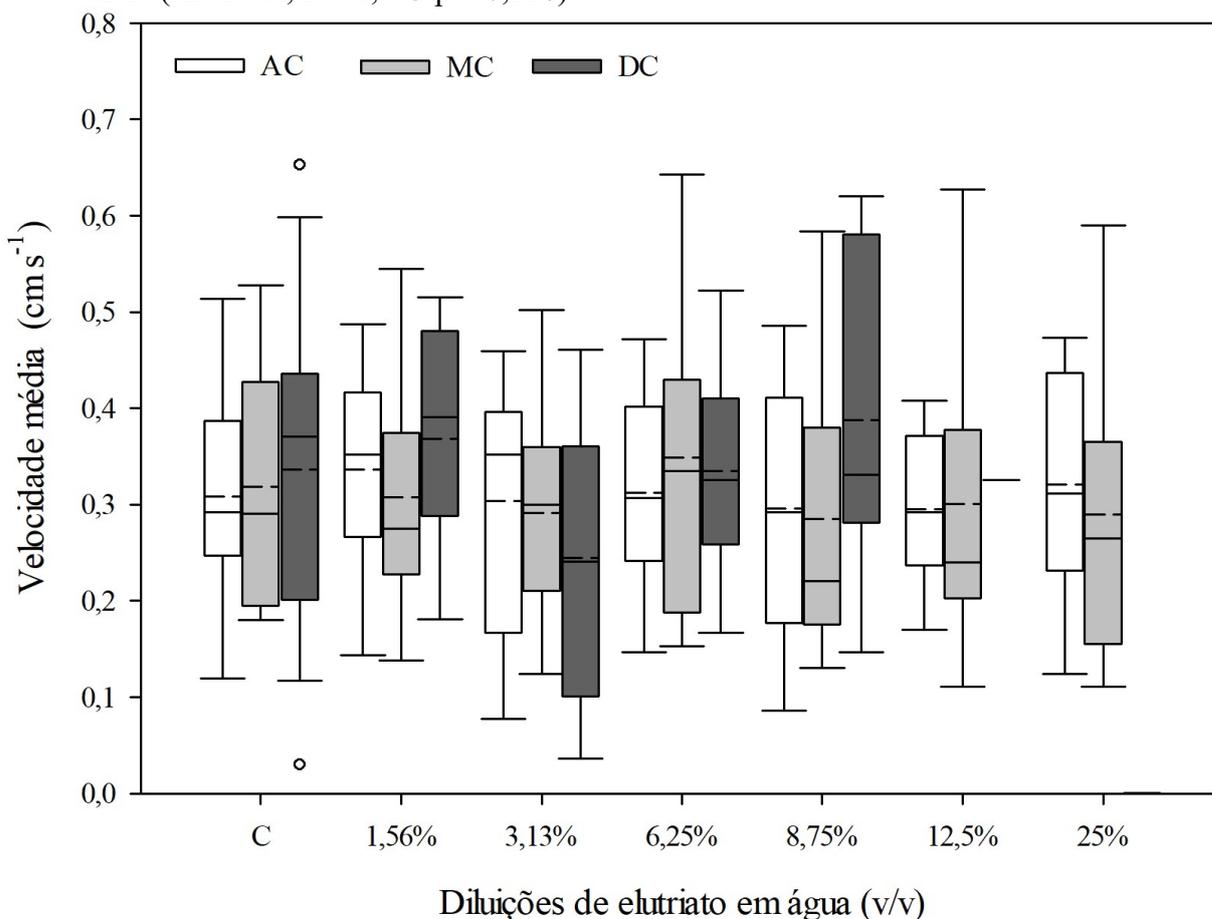
(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.6. VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA MÉDIA

As larvas expostas às diluições de elutriato das estações AC, MC e DC não apresentaram diferença estatística no parâmetro velocidade média (Figura 5).

Figura 5. Quadro de gráficos da velocidade natatória espontânea média expressa em (cm s^{-1}). Análise realizada com as diferentes estações de coleta no rio Ipojuca na cidade de Caruaru. A: AC (ANOVA, $F = 0,217$ $p = 0,97$); MC: (Kruskal-Wallis, $H = 2,289$ $p = 0,891$) DC: (ANOVA, $F = 1,443$ $p = 0,216$).



3.7. MEDIDA MORFOMÉTRICA

O comprimento total dos organismos expostos às diluições de elutriato da amostra AC não apresentaram diferença estatística para este parâmetro (Figura 6). As larvas expostas às diluições de elutriato da estação MC apresentaram redução estatística do crescimento nos tratamentos 1,56%, 3,13%, 6,25% e 25% quando comparados ao controle (Figura 6). Já as diluições da estação DC apresentaram redução estatística do comprimento total larval nos tratamentos 8,75% e 12,5% quando comparados ao controle (Figura 6).

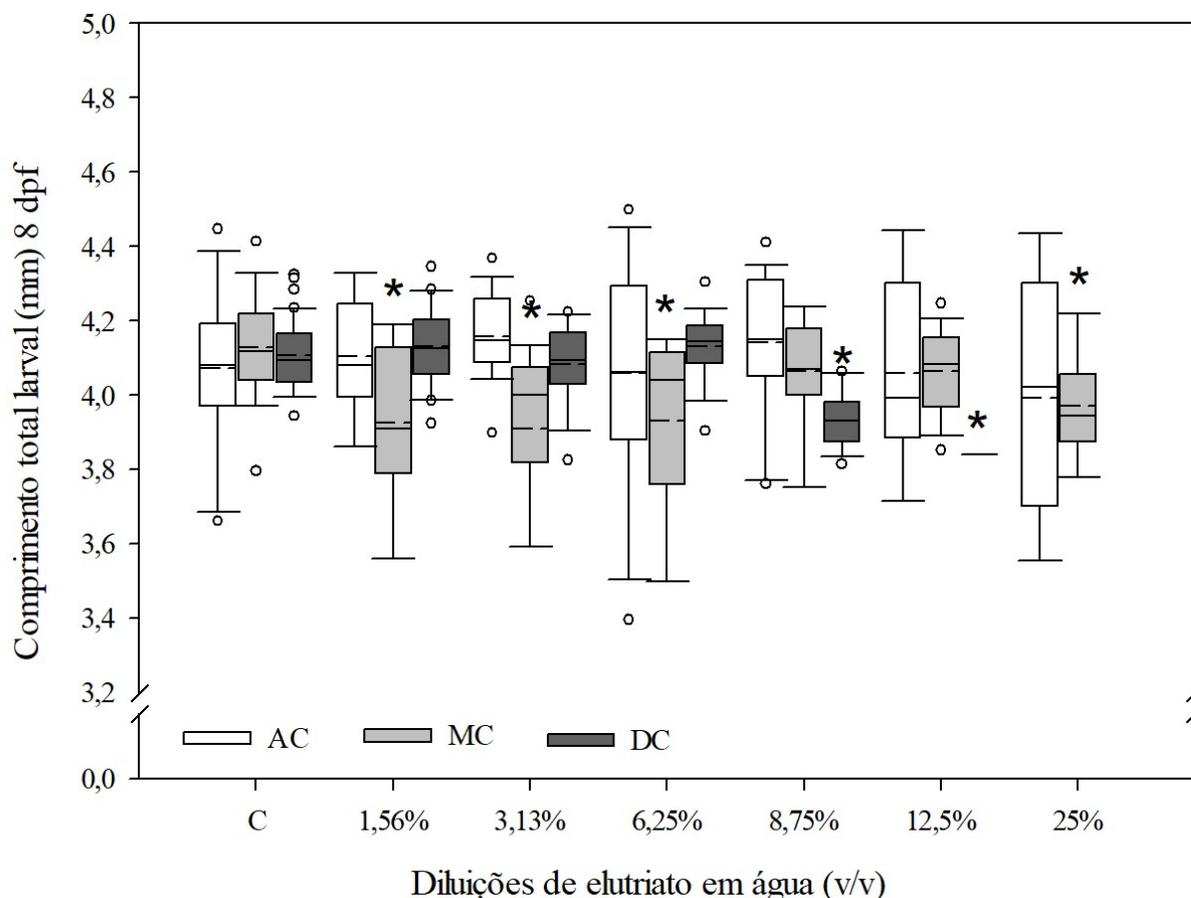
Figura 6. Comprimento total de larvas de *Danio rerio* 8 dias após a fertilização (dpf) expostas a água superficial e diluições do elutriato de estações de coleta do Rio Ipojuca na cidade de Caruaru e a água controle (C).

AC Kruskal-Wallis, $H = 5,154$ $p = 0,524$);

MC (ANOVA, $F = 4,785$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$)

DC (ANOVA, $F = 12,485$ $p \leq 0,001$, Dunnett $p < 0,05$).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle.



3.8. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

3.8.1. Acetilcolinesterase (AChE)

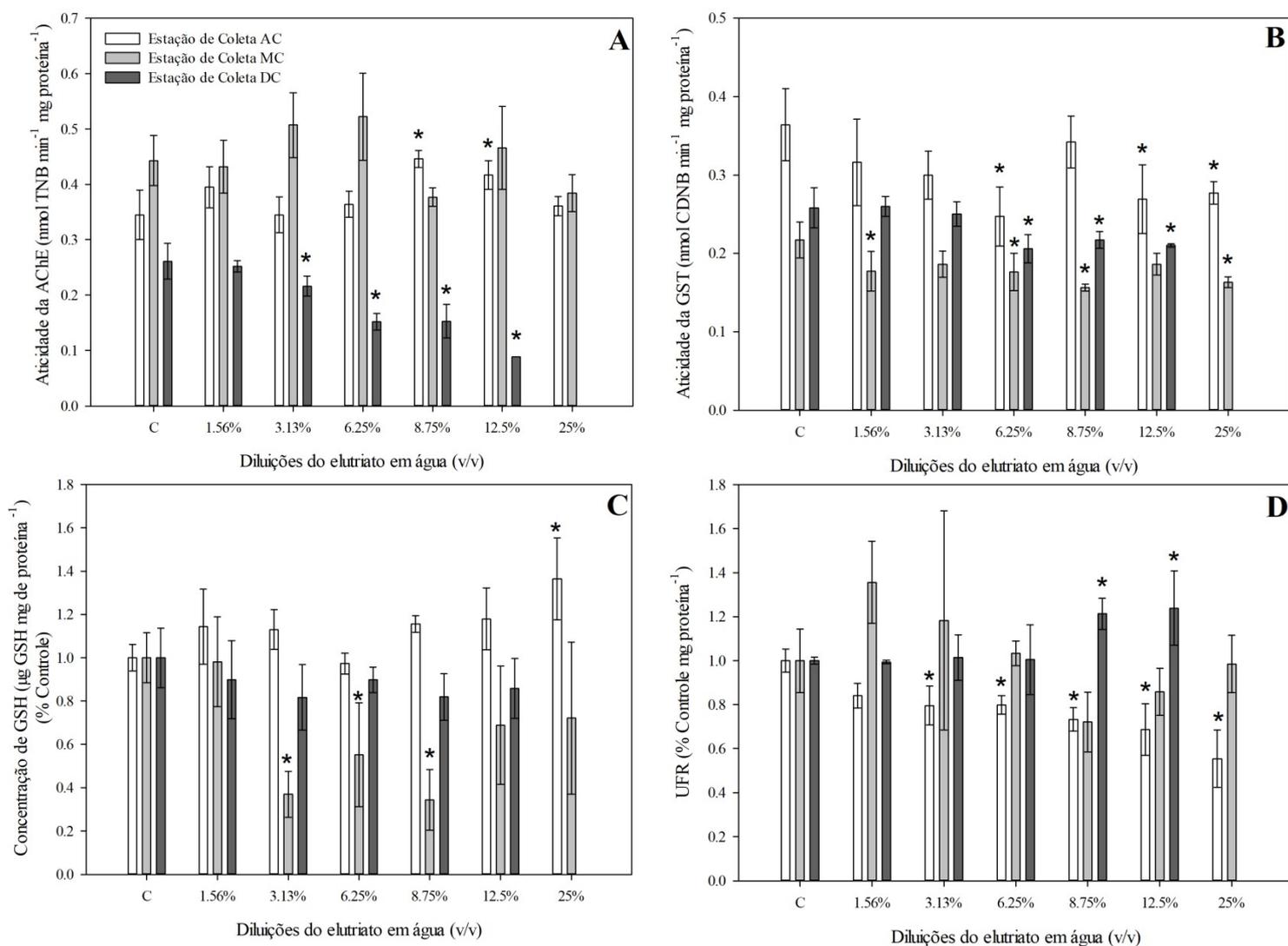
A Acetilcolinesterase foi estatisticamente induzida nos tratamentos 8,75% e 12,5% quando comparadas ao controle após 96 h de exposição na amostra da estação AC. Os tratamentos MC não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle da estação MC. Os tratamentos da estação DC apresentaram inibição estatística nos tratamentos 3,13%, 6,25%, 8,75% e 12,5% (Figura 7A).

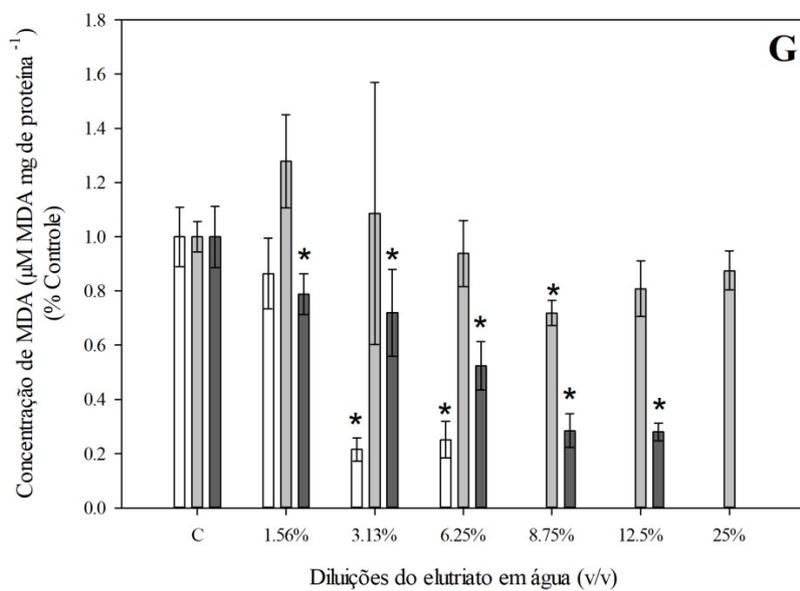
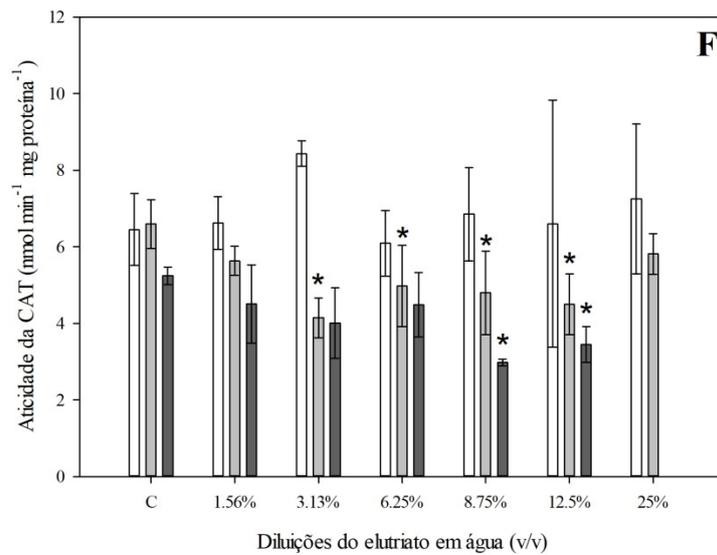
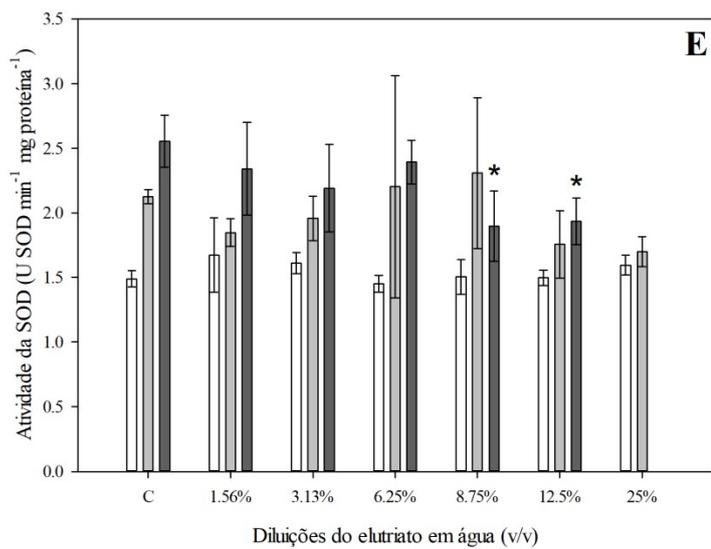
3.8.2. Glutathione-S-Transferase (GST)

A GST foi estatisticamente inibida nos tratamentos 6,25%, 12,5% e 25% quando comparadas ao controle após 96 h de exposição na amostra da estação AC. Os tratamentos 1,56%, 6,25%, 8,75% e 25% da estação MC foram estatisticamente inibidos quando comparadas ao controle. Os tratamentos da estação DC 6,25%, 8,75% e 12,5% foram estatisticamente inibidos quando comparados ao controle (Figura 7B).

Figura 7. Atividade bioquímica quantificada nos pool de larvas com 24 hpf A- Gráfico da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) expresso em ($\text{nmol TNB min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) B- Gráfico da atividade enzimática da glutationa-s-transferase (GST) expresso em ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) C- Gráfico da concentração de GSH ($\mu\text{g de GSH mg proteínta}^{-1} \text{ \%controle}$) D- Gráfico da quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) expresso em unidade de fluorescência relativa UFR ($\% \text{ of control mg protein}^{-1}$) E- SOD expressa em ($\text{U SOD mg proteínta}^{-1}$) F- Catalase expressa pelo consumo do peróxido ($\text{nmol min}^{-1} \text{protein}^{-1}$) G- POL expresso em ($\mu\text{M de MDA mg proteínta}^{-1} \text{ \%controle}$).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (Kruskal-Wallis, Dunn $p < 0,05$) ou (ANOVA, Dunnett $p < 0,05$).





3.8.3. Glutathione (GSH)

A GSH teve maior concentração no tratamento 25% da estação AC quando comparado ao controle. Os tratamentos 3,13%, 6,25% e 8,75% da estação MC tiveram concentrações de GSH estatisticamente menores que o controle. Os tratamentos da estação DC não diferiram estatisticamente (Figura 7C).

3.8.4. Espécies reativas de Oxigênio (ERO)

A fluorescência relativa das EROs reduziram concentração dependente nos tratamentos 3,13%, 6,25%, 8,75%, 12,5% e 25% da estação AC quando comparados ao controle. As amostras da estação MC não foram estatisticamente diferentes do controle. As amostras 8,75% e 12,5% da estação DC apresentaram maior fluorescência relativa das ERO quando comparadas ao controle (Figura 7D).

3.8.5. Superóxido Dismutase (SOD)

Não houve diferença estatística na atividade SOD das estações AC e MC. A SOD foi estatisticamente inibida nos tratamentos 8,75% e 12,5% quando comparadas ao controle da estação DC (Figura 7E).

3.8.6. Catalase (CAT)

Os tratamentos da estação AC não diferiram estatisticamente para a CAT. A CAT foi estatisticamente inibida nos tratamentos 3,13%, 6,25%, 8,75% e 12,5% da estação MC quando comparados ao controle. A CAT também foi inibida nos tratamentos 8,75% e 12,5% da estação DC (Figura 7F).

3.8.7. Peroxidação Lipídica (POL)

A concentração de PLO foi estatisticamente menor nos tratamentos 3,13% e 6,25% da estação de coleta AC. Não foram detectadas concentrações de malondialdeído (MDA) nos tratamentos 8,75%, 12,5% e 25% da estação AC. O tratamento 8,75% da estação MC apresentou concentração de MDA estatisticamente menor que o controle. As concentrações de MDA reduziram concentração dependente em todos os tratamentos da estação DC quando comparados ao controle (Figura 7G).

4. DISCUSSÃO

A elevada toxicidade para as larvas de *Danio rerio* verificada após exposição a amostras de água superficial e elutriato das estações MC e DC em contraste com uma menor toxicidade verificada para larvas expostas à água superficial e sedimentos da estação AC sugere que a urbanização e as atividades geradoras de efluentes na cidade de Caruaru são determinantes para os efeitos encontrados. As taxas de mortalidade das larvas expostas às

águas superficiais e aos elutriatos foram maiores em DC, seguidos de MC e AC. A mortalidade nas estações MC e DC foi em parte associada ao travamento do desenvolvimento embrionário antes de 24 hpf, onde os indivíduos não prosseguem desenvolvendo as demais estruturas corporais e morrem (Figura 3B) (Tabela 4). Essa mortalidade nos estágios iniciais de desenvolvimento foi descrita para larvas de *Danio rerio* expostas a baixas concentrações de fármacos como o acetaminofen (Paracetamol) (Galus *et al.*, 2013; Galus *et al.*, 2020), presente em águas superficiais de regiões que recebem efluentes domésticos (Veras *et al.*, 2019; Singh e Suthar, 2021). Contudo é importante ressaltar a importância da amônia e as concentrações de HPA no mesmo ambiente que podem ter atuado como cofatores ou potencializado. A concentração de NH_3 que causa 95% de mortalidade a *D. rerio* após exposição por 96h durante a fase embriolarval desde a fase de ovo fertilizado ($\text{LC}_{95}\text{-NH}_3_{96\text{h}}$) é igual a $2,99 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (limites de confiança fiduciais inferior = 2,82, superior = 3,18) (Mariz Jr, C.F. capítulo 2 do mestrado). Portanto, as concentrações de NH_3 verificadas nas diluições de elutriato e água superficial da estação DC não permitem explicar isoladamente a mortalidade de 100% detectada ao longo deste estudo, confirmando que esta elevada mortalidade é também significativamente influenciada por outras moléculas presentes na mistura complexa encontrada.

A AChE é uma importante enzima que quando desregulada pode gerar uma série de consequências comportamentais e cognitivas (Picciotto *et al.*, 2012; Vuaden *et al.*, 2012). A atividade da AChE foi induzida nas larvas expostas à estação AC e inibida após exposição às estações MC e DC (Figura 7A). A indução da Acetilcolinesterase não foi correlacionada com nenhum dos contaminantes quantificados neste trabalho, contudo a indução da mesma já foi associada à exposição ao propanol, importante solvente da indústria farmacêutica, em adultos de *Phallogeros harpagos* (De Oliveira Dos Santos *et al.*, 2020). Já a inibição da atividade da AChE encontrada em MC e DC pode estar associada a exposição a amônia (Mariz Jr, C.F. Capítulo 2) e a HPA, uma vez que misturas ambientais dos quais esteve presente houve inibição na atividade desta enzima (Giltrap *et al.*, 2017), HPA isolado como o Benzo[a]Pireno presente nas amostras testadas (Vieira *et al.*, 2008).

As glutathiona-s-transferases são um importante grupo enzimático que possui múltiplas funções, como a biotransformação de xenobióticos, desintoxicação de produtos oxidativos e catalisa a conjugação dessas substâncias eletrofílicas com o tripeptídeo glutathiona (GSH) (Ruas *et al.*, 2008). A GSH é um importante antioxidante não enzimático e seu conteúdo reflete o potencial antioxidante das organelas (Yu *et al.*, 2019). A GSH juntamente com a

GST e Glutathione peroxidase (GPx) são um importante grupo que atuam diretamente na defesa antioxidante. Desta forma reduções na atividade da GST encontrado nas três estações de Caruaru pode demonstrar uma possível susceptibilidade destes organismos a possíveis danos oxidativos. Além disso, os organismos podem estar mais propensos às consequências da exposição aos HPA, dos quais as GST e GSH atuam em processos de biotransformação de fase II (Van Der Oost *et al.*, 2003). A GSH em maior concentração na estação AC pode estar diretamente relacionada com a redução das ERO presentes no mesmo tratamento, enquanto que sua redução na estação MC pode ter favorecido a presença da mesma. As defesas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram inibidas neste trabalho (Figura 7E e F), e em contrapartida o marcador de dano oxidativo a membranas POL também reduziu em concentração em todas as amostras. É sabido que a inibição de um antioxidante pode ser compensada por outro antioxidante (Zhang *et al.*, 2016) e, além disso, a glutathione peroxidase (GPx) pode inibir ou reduzir a peroxidação lipídica (POL) (Budni *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014). As larvas de *D. rerio* quando expostas a fármacos da classe das tetraciclina podem ter a expressão gênica de suas defesas antioxidantes inibidas (Yu *et al.*, 2019), levando em consideração que as amostras em questão estão diretamente ligadas ao esgoto doméstico pode existir essa possibilidade.

O atraso no desenvolvimento embrionário foi maior nas amostras das estações MC e DC, onde existem as maiores concentrações de amônia e HPA. O atraso no GMS pode significar uma série de consequências futuras para estes organismos. A circulação sanguínea alterada que acometeu 10% do valor total exposto na diluição de 25% DC pode ter contribuído para as taxas de mortalidade. Em ambas as situações testadas neste trabalho foi reestabelecido os valores de oxigênio, além disso, as concentrações de amônia quantificadas nas amostras que não foi superior a $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ de NH_3 não são suficientes para matar 100% dos embriões expostos (Mariz Jr, C.F. Capítulo 2). A exposição a derivados de petróleo com quantidade significativa de HPA pode ter relação direta com o que foi observado neste trabalho sendo alguns deles: atraso no desenvolvimento do aparato bucal e ausência de insuflamento da bexiga natatória (Incardona *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2017). Ainda sendo possível observar alguns problemas relacionados à ausência de circulação sanguínea associada à exposição à amônia não ionizada (Mariz Jr, C.F. Capítulo 2). Muitos destes foram quantificados como patologias (Tabela 4A e B), além de outros que são clássicos da exposição à HPA como a presença de edemas pericárdicos e perivitelínicos (Incardona *et al.*, 2004; Incardona *et al.*, 2014).

As patologias encontradas neste trabalho podem influenciar diferentes processos da vida de peixes em seus nichos ecológicos. As patologias malformação da notocorda, ausência de nadadeiras peitorais, bexiga natatória não insuflada e problemas no desenvolvimento da cauda geram problemas diretos na natação, base para todas as funções biológicas destes organismos. A ausência de insuflamento da bexiga natatória é um problema significativo para larvas, pois é uma estrutura necessária para melhorar sua estabilidade na coluna d'água e consequentemente auxiliar em processos de captura de presas, sendo sua ausência mais custosa energeticamente para estes organismos (Czesny *et al.*, 2005). A exposição de *Danio rerio* na fase embriolarval a NH_3 nas concentrações de 0,061 aumenta a 27,5% de larvas com falha no insuflamento da bexiga (Mariz Jr, C.F. Capítulo 2), assim como os HPA que tanto isolados quanto em misturas também afetam o insuflamento da bexiga (Incardona *et al.*, 2004; Vergauwen *et al.*, 2015). Além disso, patologias como o desenvolvimento do aparato bucal comprometido geram anormalidades da fase adulta quando o *D.rerio* é exposto a misturas de HPA, sendo este fato responsável por reduções na captura de presas e consequente redução do crescimento (Vignet, Devier, *et al.*, 2014; Vignet, Le Menach, *et al.*, 2014).

Diferentes grupos de contaminantes ambientais como HPA e PCBs são conhecidos por serem cardiotoxicos em peixes nos estágios iniciais da vida (Incardona e Scholz, 2016). A NH_3 também é cardiotoxica para embriões e larvas de *D. rerio*, reduzindo a frequência cardíaca em 48 e 72 hpf a partir da exposição a concentrações de 2,527 e 0,061 $\text{mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente (Mariz Jr, C.F. Capítulo 2). Desta forma a bradicardia encontrada nas larvas expostas as diluições de elutriato das estações AC e DC podem estar ligadas a amônia presente nas amostras testadas que em 25% corresponde valores superiores a 0,1 mg L^{-1} (Tabela 1). Contudo é importante ressaltar que a redução na frequência cardíaca pode ter influenciado, também, nos problemas circulatórios encontrados (Tabela 4A), e consequentemente influenciado na absorção do vitelo que depende sistema circulatório para sua total absorção (Kamler, 2007). Outro fenômeno encontrado para o mesmo parâmetro foi à taquicardia nas larvas exposta as diluições das estações MC e AC, em suas diluições mais concentradas. Embriões do peixe *Oryzias latipes* quando expostos ao HPA Benzo[a]antraceno desenvolvem taquicardia (Le Bihanic *et al.*, 2015), o HPA em questão foi detectado nas águas superficiais em baixas concentrações nas estações MC e DC (Tabela 2). Além disso, o mesmo efeito pode ser causado pela exposição das fases embriolarvais do *D.rerio* a Éteres difenílicos polibromados (PBDE), substância adicionada a plásticos, espuma de poliuretano e produtos

têxteis como um retardador de chama (Lema *et al.*, 2007). A região de coleta é marcada pela produção de produtos têxteis (Secta/Pnma, 2003).

As malformações, além da não absorção do vitelo foram processos que podem ter acarretado nas reduções do comprimento larval encontrados nos organismos das estações MC e DC. A energia absorvida do vitelo nos estágios iniciais da vida do *D. rerio* é dividida principalmente entre os tecidos recém-formados e processos respiratórios dentro do ovo (Kamler, 2007). Alguns dos processos em que a energia pode ter sido redirecionada são a biotransformação e excreção de compostos como amônia por processos mais energéticos (Banerjee *et al.*, 2020) que podem está gerando alguma consequência para estes animais.

CONCLUSÃO

A exposição de *D. rerio* as amostras de água superficial brutas das três estações de coleta levou a taxas de letalidade superiores a 79%. Assim como os efeitos biológicos foram mais frequentes à medida que o rio atravessa a cidade, a amônia e os HPA também apresentaram o mesmo padrão, tendo suas maiores concentrações na estação a jusante da cidade. As larvas sobreviventes apresentaram frequências significativas de patologias, das quais, atraso no desenvolvimento da boca, ausência de circulação sanguínea e ausência de insuflamento da bexiga natatória, ambas associadas também à exposição ao NH₃, e estiveram entre as estruturas responsáveis pelo atraso no desenvolvimento embrionário. As diluições de elutriato foram menos tóxicas na estação AC, relativamente tóxicas na estação MC e muito tóxicas na estação DC, representado de modo geral por atrasos no desenvolvimento embrionário, altas frequências de patologias no desenvolvimento embriolarval e parâmetros bioquímicos alterados. Este trabalho contribui para o entendimento do potencial tóxico do sedimento do rio Ipojuca, além de demonstrar um grande potencial do *Danio rerio* para biomonitoramento de toxicidade de sedimentos límnicos.

REFERÊNCIA

ALVES, R. N. et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 178, p. 224-230, 7// 2017. ISSN 0045-6535.

ARAUJO, A. C. P. et al. Organochlorine Pesticide Contamination in the Ipojuca Basin, Brazil. **Environmental Technology**, v. 19, n. 1, p. 109-113, 1998/01/01 1998. ISSN 0959-3330.

ARRUDA-SANTOS, R. H. D. et al. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. **Science of The Total Environment**, v. 624, p. 935-944, 2018/05/15/ 2018. ISSN 0048-9697.

BANERJEE, B. et al. Molecular characterization and ornithine-urea cycle genes expression in air-breathing magur catfish (*Clarias magur*) during exposure to high external ammonia. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2247-2260, May 2020. ISSN 1089-8646 (Electronic)0888-7543 (Linking).

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952. ISSN 0021-9258.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-8, May 1963. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976. ISSN 0003-2697.

BUDNI, J. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Experimental Neurology**, v. 240, p. 112-121, 2013/02/01/ 2013. ISSN 0014-4886.

CPRH. **RELATÓRIO DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**. Recife: 2014. 104.

_____. **3.5 Ipojuca**. Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH) www.CPRH.pe.gov.br, p.13. 2020

CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D. S.; DETTMERS, J. M. Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 134, n. 4, p. 1011-1020, 2005.

DA SILVA, Y. J. A. B. et al. Bedload as an indicator of heavy metal contamination in a Brazilian anthropized watershed. **Catena**, v. 153, p. 106-113, 2017. ISSN 03418162.

DA SILVA, Y. J. A. B. et al. Heavy metal concentrations and ecological risk assessment of the suspended sediments of a multi-contaminated Brazilian watershed. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, n. 1, 03/13 2019.

DE OLIVEIRA DOS SANTOS, P. R. et al. Neurotoxic and respiratory effects of human use drugs on a Neotropical fish species, *Phalloceros harpagos*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 230, p. 108683, 2020/04/01/ 2020. ISSN 1532-0456.

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **Toxicology of Fishes**. Boca Raton: Academic Press, 2008. 1101.

DU, Z. et al. Oxidative stress and genotoxicity of the ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium bromide in zebrafish (*Danio rerio*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 67, n. 2, p. 261-9, Aug 2014. ISSN 0090-4341.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961 1961. ISSN 0006-2952.

EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010. ISSN 0166-445X.

EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975/12/01 1975. ISSN 0015-296X.

FAIRCHILD, J. F. et al. Chronic Toxicity of Un-ionized Ammonia to Early Life-Stages of Endangered Colorado Pikeminnow (*Ptychocheilus lucius*) and Razorback Sucker (*Xyrauchen texanus*) Compared to the Surrogate Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 378-384, 2005/10/01 2005. ISSN 1432-0703.

GALUS, M. et al. Prostaglandins prevent acetaminophen induced embryo toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103463, 2020/11/01/ 2020. ISSN 1382-6689.

GALUS, M. et al. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. **Aquat Toxicol**, v. 132-133, p. 200-11, May 15 2013. ISSN 0166-445x.

GILTRAP, M. et al. Integration of biological effects, fish histopathology and contaminant measurements for the assessment of fish health: A pilot application in Irish marine waters.

Marine Environmental Research, v. 129, n. Supplement C, p. 113-132, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0141-1136.

GUNKEL, G. et al. Sugar Cane Industry as a Source of Water Pollution – Case Study on the Situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 180, n. 1, p. 261-269, 2007/03/01 2007. ISSN 1573-2932.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

INCARDONA, J. P. et al. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 12, p. 1755-62, Dec 2005. ISSN 0091-6765 (Print)0091-6765 (Linking).

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity in early life history stages of fish. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 363, 2004.

INCARDONA, J. P. et al. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1510-E1518, 2014.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 515-525, 2016.

KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, n. 2, p. 143, 2007/08/18 2007. ISSN 1573-5184.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976.

LE BIHANIC, F. et al. Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 321-328, 3// 2015. ISSN 0147-6513.

LEMA, S. C. et al. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). **Aquat Toxicol**, v. 82, n. 4, p. 296-307, May 31 2007. ISSN 0166-445X (Print)0166-445X (Linking).

LEMOS, R. T.; DE CARVALHO, P. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. **Mar Pollut Bull**, v. 82, n. 1-2, p. 183-8, May 15 2014. ISSN 1879-3363 (Electronic)0025-326X (Linking).

LI, D.; LIU, S. Chapter 7 - Detection of River Water Quality. In: LI, D. e LIU, S. (Ed.). **Water Quality Monitoring and Management**: Academic Press, 2019. p.211-220. ISBN 978-0-12-811330-1.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of biomolecular techniques : JBT**, v. 18, n. 4, p. 185-187, 2007/09// 2007. ISSN 1524-0215.

MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol**, v. 196, p. 132-145, Mar 2018. ISSN 1879-1514 (Electronic)0166-445X (Linking).

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974. ISSN 0014-2956.

MASTRAL, A. M.; CALLÉN, M. S. A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 15, p. 3051-3057, 2000/08/01 2000. ISSN 0013-936X.

MILTNER, R. J.; WHITE, D.; YODER, C. The biotic integrity of streams in urban and suburbanizing landscapes. **Landscape and Urban Planning**, v. 69, n. 1, p. 87-100, 2004. ISSN 01692046 (ISSN).

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

PICCIOTTO, MARINA R.; HIGLEY, MICHAEL J.; MINEUR, YANN S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012/10/04/ 2012. ISSN 0896-6273.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 17-23, 9// 2002. ISSN 0025-326X.

ROMÉO, M.; GIAMBÉRINI, L. History of Biomarkers. In: (Ed.). **Ecological Biomarkers**: CRC Press, 2013. p.15-44. ISBN 978-1-4398-8017-3.

RUAS, C. B. G. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 86-93, 2008/09/01/ 2008. ISSN 0147-6513.

SECTA/PNMA. **Levantamento das Fontes Poluidoras na Bacia do Rio Ipojuca** SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. M. A. D. P. Recife - PE: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco: 54 p. 2003.

SINGH, V.; SUTHAR, S. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India. **Chemosphere**, v. 268, p. 129331, 2021/04/01/ 2021. ISSN 0045-6535.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003/02/01/ 2003. ISSN 1382-6689.

VERAS, T. B. et al. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, p. 961-969, 2019/05/01/ 2019. ISSN 0045-6535.

VERGAUWEN, L. et al. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. **Chemosphere**, v. 139, p. 9-17, 2015.

VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of The Total Environment**, v. 395, n. 2, p. 87-100, 2008/06/01/ 2008. ISSN 0048-9697.

VIGNET, C. et al. Long-term disruption of growth, reproduction, and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAH-spiked sediment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 24, p. 13877-13887, 2014.

VIGNET, C. et al. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish - part I: Survival and growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 24, p. 13804-13817, 2014.

VUADEN, F. C. et al. Long-Term Methionine Exposure Induces Memory Impairment on Inhibitory Avoidance Task and Alters Acetylcholinesterase Activity and Expression in Zebrafish (*Danio rerio*). **Neurochemical Research**, v. 37, n. 7, p. 1545-1553, 2012/07/01 2012. ISSN 1573-6903.

WÖLZ, J. et al. Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3327-3333, 2010/07/15/ 2010. ISSN 0048-9697.

YU, X. et al. Tetracycline antibiotics as PI3K inhibitors in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative stress in zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 226, p. 696-703, 2019.

ZHANG, Q. F. et al. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. **Aquat Toxicol**, v. 181, p. 76-85, Dec 2016. ISSN 0166-445x.

ZHAO, X. et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 136–137, p. 49-59, 7/15/ 2013. ISSN 0166-445X.

ANEXO 1

Tabela 4. Dados do índice de estado trófico (IET) e índice de qualidade de água (IQA) dos dois anos de coleta.

Estação	IET 2018	IET - Classificação 2018	IET 2019	IET - Classificação 2019	IQA 2018	IQA - Qualificação 2018	IQA 2019	IQA - Qualificação 2019
IP01	66,92	Supereutrófico	-	-	50	Aceitável	-	-
IP38	72,31	Hipereutrófico	-	-	-	-	-	-
IP49	78,24	Hipereutrófico	81	Hipereutrófico	20	Péssima	12	Péssima
IP55	76,09	Hipereutrófico	79	Hipereutrófico	33	Ruim	33	Ruim
IP64	72,17	Hipereutrófico	-	-	46	Aceitável	-	-
IP85	64,04	Hipereutrófico	-	-	-	-	-	-
IP90	61,47	Hipereutrófico	62	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP01	-	-	67	Hipereutrófico	-	-	45	Aceitável
IP38	71,46	Hipereutrófico	74	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP49	82,91	Hipereutrófico	78	Hipereutrófico	16	Péssima	17	Péssima
IP55	78,56	Hipereutrófico	74	Hipereutrófico	41	aceitável	39	Aceitável
IP64	74,76	Hipereutrófico	72	Hipereutrófico	44	aceitável	41	Aceitável
IP85	61,82	Hipereutrófico	68	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP90	59,17	Hipereutrófico	66	Hipereutrófico	70	Boa	54	Boa
IP01	-	-	61	Eutrófico	-	-	44	Aceitável
IP38	71,13	Hipereutrófico	71	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP49	76,09	Hipereutrófico	81	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP55	76,64	Hipereutrófico	78	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP64	-	-	70	Hipereutrófico	-	-	-	-
IP85	65,92	Hipereutrófico	65	Supereutrófico	-	-	-	-
IP90	67,29	Hipereutrófico	64	Supereutrófico	25	Ruim	21	Ruim

ANEXO 2

Figura 8. Mapas da trajetória natatória espontânea durante 5 min de monitoramento de larvas de *Danio rerio* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de NH_3 .

