



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



ROXANNY HELEN DE ARRUDA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA ESTUARINO DO RIO
CAPIBARIBE UTILIZANDO MARCADORES ESPECÍFICOS DE ESGOTO
DOMÉSTICO BEM COMO SEUS EFEITOS TÓXICOS PARA PEIXES**

Recife

2023

ROXANNY HELEN DE ARRUDA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA ESTUARINO DO RIO
CAPIBARIBE UTILIZANDO MARCADORES ESPECÍFICOS DE ESGOTO
DOMÉSTICO BEM COMO SEUS EFEITOS TÓXICOS PARA PEIXES**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Oceanografia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Oceanografia.**

**Área de concentração: Oceanografia
Abiótica.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliete Zanardi Lamardo.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho.

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- S237d Santos, Roxanny Helen de Arruda.
Avaliação da contaminação do sistema estuarino do Rio Capibaribe utilizando marcadores específicos de esgoto doméstico bem como seus efeitos tóxicos para peixes / Roxanny Helen de Arruda Santos. - 2023.
165 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientadora: Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2023.
Inclui Referências.
Parte do texto em inglês.
1. Oceanografia. 2. Marcadores químicos. 3. Marcador elementar. 4. Marcador isotópico. 5. Surfactantes. 6. Efluentes urbanos. 7. Toxicidade. I. Lamardo, Eliete Zanardi (Orientadora). II. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (Coorientador). III. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.)

BCTG/2023- 155

ROXANNY HELEN DE ARRUDA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA ESTUARINO DO RIO
CAPIBARIBE UTILIZANDO MARCADORES ESPECÍFICOS DE ESGOTO
DOMÉSTICO BEM COMO SEUS EFEITOS TÓXICOS PARA PEIXES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Oceanografia. Área de concentração: Oceanografia Abiótica.

Aprovada em: 28/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Eliete Zanardi Lamardo (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Lilia Pereira de Souza Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Manuel de Jesus Flores Montes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Romulo Nepomuceno Alves (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Bahia

Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro (Examinador Externo)
Universidade Federal de São Paulo

À minha família, minha mãe, Ana Lúcia, e meu pai, Edinaldo José por todo apoio e incentivo e por sempre acreditar no meu potencial. Ao meu marido, Emerson Barbosa, por toda paciência e amor dedicados a mim. Em especial, a minha afilhada, Annaliz Arruda que é um presentinho de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por nunca ter me deixado desistir, por ter me dado força e sabedoria para que eu conseguisse finalizar mais este ciclo, por todas as bênçãos a mim concedidas e por colocar pessoas tão especiais na minha vida.

À minha querida orientadora Eliete Zanardi Lamardo, por todo conhecimento transmitido ao longo desses 11 anos de convivência e parceria, que com certeza me fizeram a profissional que sou hoje. Obrigada por todo apoio, carinho, amizade, dedicação, por sempre acreditar no meu potencial e me mostrar que sou capaz de alcançar todos meus objetivos. Agradeço a Deus por tê-la como minha orientadora!

Ao meu co-orientador Paulo Sérgio Martins de Carvalho, por ser sempre solícito e atencioso, pelos ensinamentos compartilhados e por me auxiliar nos momentos de dúvida. Ao professor Gilvan Takeshi Yogui por estar sempre disposto a ajudar e pelos conhecimentos compartilhados durante a elaboração dessa tese.

À minha querida equipe do OrganoMAR! Obrigada Fiamma, Daywison, Beatriz, Júlia Griz, Lia, Lino, Thaysa, Eduardo, Evelin por todo incentivo, companherismo e ajuda nas extrações do LAS, que é uma verdadeira força tarefa para conseguir realizar (kkkkkkkk). Em especial, ao querido Bruno, mais conhecido como “doctor”, por toda ajuda na parte estatística, por dividir seus conhecimentos comigo, pela ajuda nas coletas, análises/extrações e por ter mergulhado comigo nesse mundo novo dos indicadores de esgotos. E principalmente, pela nossa amizade e por sempre me incentivar com suas palavras sábias nos momentos de angústia. Minha eterna gratidão!

As minhas organomarinhas lindas, Amandinha, Carol e Tainá que apesar de estarem distantes no momento, sempre se fizeram presentes de alguma forma. Obrigada pelas palavras de apoio, conversas, conselhos, risadas e pela nossa amizade. Vocês fazem muita falta no meu dia-a-dia. Agradeço também a rainha dos crustáceos, Juliana Lemos, que também se tornou uma organomarinha. Obrigada pela nossa amizade e por sempre estar disposta a me ajudar. Saudades, amiga!

À toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia Áquatica (LABECOTOX), em especial a Maria, Shaieny, João e Bruna, por me receberem de braços abertos e por toda ajuda enquanto eu estava fazendo os testes de toxicidade. E, principalmente ao Célio por dividir comigo seu conhecimento, por ter me ensinado e auxiliado nos testes de toxicidade, por esclarecer minhas dúvidas e por tornar tudo mais leve, apesar de ser tudo muito novo para

mim. Obrigada por todas as conversas, risadas e por aguentar meus apanchamentos (kkkkkkkk). Sou eternamente grata! A nossa amizade foi uma das melhores coisas que ganhei nesse doutorado.

Às minhas amigas de infância Daniele, Vilmara e Karina que me acompanham desde sempre, agradeço pela amizade, carinho, conselhos, risadas, pelos momentos de descontração, por estarem sempre presentes e me apoiando nos momentos mais importantes da minha vida. Amo vocês!

À toda minha família, que sempre me motivaram e estiveram ao meu lado, em especial aos meus pais e irmãos, por todo amor, apoio e carinho dedicados a mim. Obrigada por tudo! Amo vocês!

À minha sobrinha e afilhada Annaliz, por trazer ainda mais alegria para nossas vidas e me proporcionar momentos de puro amor.

Ao meu marido Emerson Barbosa, por sempre me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, pela parceria de todos esses anos, pela paciência, compreensão e por toda amizade e carinho. Te amo!

À toda equipe do Departamento de Oceanografia da UFPE que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, sempre muito solícitos e atenciosos.

À todos os membros da banca, primeiramente por aceitarem o convite para avaliar o meu trabalho, e por disponibilizarem tempo e conhecimento para melhorar este documento.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

Os surfactantes alquilbenzenos sulfonatos lineares (LAS) são compostos orgânicos comumente utilizados nas formulações de detergentes. Estes compostos e seus precursores, os alquilbenzenos lineares (LABs), são introduzidos nos ecossistemas aquáticos através da descarga de efluentes domésticos. Estes são frequentemente encontrados em concentrações relevantes quando comparados a outros analitos presentes no esgoto, sendo considerados bons indicadores da presença destes efluentes. O presente estudo teve como objetivo avaliar o grau de contaminação do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC) por esgoto doméstico através de marcadores elementar (razão $(C/N)_a$), isotópico ($\delta^{13}C$) e molecular (LAB e LAS), bem como os efeitos tóxicos destes contaminantes sobre a fase embriolarval do peixe *Danio rerio*. Para realização das análises foram coletadas sete amostras de sedimento e água ao longo do SERC, durante os períodos seco e chuvoso. Os sedimentos foram caracterizados quanto a origem da matéria orgânica, granulometria e concentração de LAB. Na água foram analisados o percentual de material particulado em suspensão (MPS), carbono orgânico particulado e concentração de LAS. Em relação ao sedimento, há um processo significativo de diluição do CO derivado de esgoto pelo fitoplâncton estuarino. A contaminação do sedimento por LAB foi classificada como moderada (concentrações entre 200 – 2000 ng g⁻¹) para as duas estações do ano (seco-chuvoso), sendo os maiores valores observados nas áreas sob a influência da pluma de esgoto e na Zona de Turbidez Máxima (ZTM) da região. Foi observado aumento/redução substancial entre os períodos estudados. Além disso, não houve diferença sazonal significativa no grau de degradação destes compostos, refletindo a condição heterotrófica desse ambiente durante todo o ano. A concentração de LAS em água variou de 0,05 a 1,53 mg L⁻¹ (mediana = 0,12 mg L⁻¹), caracterizando esse ambiente como contaminado por esses compostos. As maiores concentrações foram registradas no médio estuário, onde há maior influência da pluma de esgoto. Não houve diferenças significativas na concentração de LAS entre os períodos seco e chuvoso. Entretanto, a alta variabilidade nos resultados no período chuvoso sugerem uma competição entre os processos de diluição, devido ao maior aporte pluvial e fluvial, versus o maior aporte decorrentes da lixiviação urbana e do aumento da vazão dos efluentes das estações de tratamento de esgoto. As exceções observadas foram nas estações sob influência direta do Rio Beberibe e na ZTM, que apresentaram concentrações menores no período chuvoso. Os testes ecotoxicológicos realizados com as concentrações ambientalmente relevantes para a área do SERC, demonstraram que tanto o surfactante (C₁₂-LAS) como o seu precursor (C₁₂-LAB) são tóxicos para os embriões de *D.*

rerio, ocasionando efeitos letais e/ou subletais. O potencial tóxico do LAS é maior em comparação com o LAB, causando mortalidade e um aumento no atraso do desenvolvimento morfológico de forma dose dependente. Este estudo destaca a necessidade urgente de melhorar a cobertura e o processo de tratamento de efluentes aolongo do Rio Capibaribe e áreas adjacentes, a fim de mitigar o potencial tóxico deste ecossistema tão importante do ponto de vista socioambiental.

Palavras-chave: marcadores químicos; marcador elementar; marcador isotópico; surfactantes; efluentes urbanos; toxicidade.

ABSTRACT

Surfactants linear alkylbenzene sulfonates (LAS) are organic compounds commonly used in detergent formulations. These compounds and their precursors linear alkylbenzenes (LABs) are introduced into aquatic ecosystems through urban effluents discharges. These are often reported in relevant concentrations when compared to other analytes present in sewage and are considered good indicators of these effluents. The present study aimed to evaluate the degree of contamination of the Capibaribe Estuarine System (CES) by domestic sewage through elemental (C/N_a), isotopic ($\delta^{13}\text{C}$) and molecular markers (LAB and LAS), as well as the toxic effects of these contaminants on the embryolarvae phase of the *Danio rerio* fish. Seven samples of sediment and water were collected along the CES, during dry and wet periods. The sediments were characterized according to the origin of organic matter, particle size and LAB concentration. In the water, the percentage of suspended particulate matter (SPM), particulate organic carbon and LAS concentration were analyzed. Regarding the sediment, there is a significant process of dilution of OC derived from sewage by estuarine phytoplankton. Contamination by LAB was classified as moderate (concentrations between 200 – 2000 ng g⁻¹) for the two seasons of the year (dry-wet), with the highest values observed in areas under the influence of the sewage plume and at the Maximum Turbidity Zone (TMZ) of the region. A substantial increase/decrease was observed between the studied periods. Furthermore, there was no significant seasonal difference in the degree of degradation of these compounds, reflecting the heterotrophic condition of this environment throughout the year. The LAS concentration in water ranged from 0.05 to 1.53 mg L⁻¹ (median = 0.12 mg L⁻¹), characterizing this environment as contaminated by these compounds. The highest concentrations were recorded in the mid-estuary, where the sewage plume has the greatest influence. There were no significant differences in LAS concentrations between dry and wet periods. However, the high variability in waters from wet periods suggest a competition between dilution processes, due to the higher pluvial and fluvial input, versus the higher sewage input as a result of urban leaching and the effluent flux increase from sewage treatment plants. Exceptions were observed at stations under direct influence of Beberibe River and at ZTM, which presented lower concentrations during wet season. The ecotoxicological tests carried out with the environmentally relevant concentrations for the CES area, demonstrated that both surfactant (C₁₂-LAS) and its precursor (C₁₂-LAB) are toxic for *D. rerio* embryos, causing lethal and/or sublethal effects. The toxic potential of LAS is higher compared to LAB, causing mortality and an increase in morphological developmental

delay in a dose-dependent manner. This study highlights the urgent need to improve the coverage and treatment process of effluents along the Capibaribe River and adjacent areas, in order to mitigate the toxic potential of this ecosystem, which is so important from a socio-environmental point of view.

Keywords: chemical markers; elemental marker; isotopic marker; surfactants; urban effluents; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1 –	Formúla estrutural de um alquilbenzeno linear (6-C ₁₂ -LAB)	29
Figura 2 –	Esquema das reações para obtenção do LAB e do LAS. a) reação de alquilação de uma olefina linear ou de um aleto de alquila resultando na formação do LAB. b) reação de sulfonação do LAB resultando na formação do LAS.....	30
Figura 3 –	Estrutura molecular de um alquilbenzeno sulfonato linear (5-C ₁₂ -LAS)	32
Figura 4 –	Exemplar do <i>Danio rerio</i> fêmea (a) e macho (b)	35
Figura 5 –	Destacamento da cauda de indivíduos saudáveis da espécie <i>Danio rerio</i> 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.....	36
Figura 6 –	Região dorsal do <i>Danio rerio</i> saudável com setas evidenciando os somitos já se diferenciando em Miótomos (Originando a musculatura dorsal) e Esclerótomo (Originará as vértebras em volta da notocorda). A notocorda em si destacada pela seta preta e as células sanguíneas em evidência.....	37
Figura 7 –	Desenvolvimento do olho do <i>Danio rerio</i> saudável até as 96 hpf. 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.....	37
Figura 8 –	<i>Danio rerio</i> saudável entre 24 e 96 hpf com as imagens de A-F evidenciando o progresso na quantidade de massas pigmentadas escuras em todo o comprimento larval e nos olhos. A: 0 pontos. B, C, D: 1 ponto para cabeça e corpo. E: 1 ponto para pigmentação da cauda. F: diferenciação entre corpo e cauda.....	39
Figura 9 –	Desenvolvimento da nadadeira peitoral do <i>Danio rerio</i> saudável. A: 48 hpf. B: 72 hpf. C: 96 hpf.....	40
Figura 10 –	Desenvolvimento da boca no <i>Danio rerio</i> saudável. Mandíbula inferior	

	ausente ou quando atinge apenas a metade do olho é atribuída pontuação 0; Mandíbula inferior atinge da metade do olho para frente recebe pontuação 1 (72 hpf); Mandíbula inferior atinge pelo menos até a frente do olho adquire pontuação 2.....	40
Figura 11 –	Eclosão da larva de <i>Danio rerio</i> . A: Pontuação 0 em 48 hpf. B: Pontuação 1 em 72hpf (larva após eclosão)	41
Figura 12 –	Extensão do saco vitelínico em organismos saudáveis entre 72 e 96 hpf. A: 1 ponto para extensão do saco vitelínico quase vazia (96 hpf). B: 0 pontos para quando o saco vitelínico excede o coração. Seta grossa indica saco vitelínico ultrapassando o coração. Setas finas mostram os espaços onde ficará a bexiga natatória.....	42
Figura 13 –	Insuflamento da Bexiga Natatória. A: Bexiga Natatória insuflada indicada pela seta. B: Bexiga Natatória não insuflada indicada pela seta.....	42
Figura 14 –	Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), PE, Brasil, e seus rios formadores: Rio Capibaribe, Rio Tejipió (T), Rio Jordão (J), Rio Pina (P) e Rio Beberibe (B).....	45
Figura 15 –	Cromatograma obtido no GC-MS a partir da injeção de 1 µl da solução de mistura de LABs, no modo SIM.....	48
Figura 16 –	Curvas analíticas obtidas no dia 30/03/2021 para o decilbenzeno, undecilbenzeno, tridecilbenzeno e tetradecilbenzeno, dentro da faixa de 2,5 a 5000 ng g ⁻¹	53
Figura 17 –	Comparação entre os cromatogramas do solvente e do ponto da curva para os LABs.....	54
Figura 18 –	Reação azul de metileno e surfactante aniônico.....	57
Figura 19 –	Curva analítica obtida no dia 22/09/ 2022 para LAS, dentro da faixa de 0,15 a 4,5 mg L ⁻¹	60

MANUSCRITO 1 - SEWAGE CONTAMINATION ASSESSMENT IN AN URBANIZED TROPICAL ESTUARY IN NORTHEAST BRAZIL USING ELEMENTAL, ISOTOPIC AND MOLECULAR PROXIES

Figure 1 –	Map of Capibaribe Estuarine System (NE - Brazil) and sediment sampling sites (1-7) collected in October 2020. Shaded area: Mangrove
------------	---

	Park. STP: Cabanga Sewage Treatment Plant; USD: Untreated Sewage Disposal; Dashed circle: area corresponding to the estuarine turbidity maximum (ETM).....	69
Figure 2 –	Cross-plot of $(C/N)_a$ ratio versus $\delta^{13}C$ of sedimentary organic matter from outer (Sts. #4 and #5), middle (Sts. #1, #2, #3, and #6) and inner sections (St. #7) of Capibaribe Estuarine System. The filled squares represent the mean signatures $\pm$ standard deviation of the major organic carbon sources to CES (Costa et al., 2021a). Phyto = phytoplankton from lower estuary (LE) and from middle estuary (ME).....	74
Figure 3 –	Loadings of variables in components from the principal component analysis (a) and non-metric multidimensional scaling (MDS) plot (b) constructed using the mud and organic carbon (OC) contents, $(C/N)_a$ ratio, $\delta^{13}C$ values, total linear alkylbenzenes (LAB) concentrations and $I/E_{(11-13)}$ ratio. MDS grouped samples according to similarities among them: lower estuary (G1, including Sts. #4 and 5), under direct sewage plume influence sources (G2, including Sts. #2, #3, and #6), river's confluence (G3, only St. #1) and estuarine turbidity maximum (G4, only St. #7)	75
	MANUSCRITO 2 - SEWAGE OUTFLOW AND CONTAMINATION BY LINEAR ALKYL BENZENES AND THEIR ANIONIC SURFACTANT IN A BRAZILIAN TROPICAL URBAN ESTUARY, DURING WET AND DRY SEASONS	
Figure 1 –	Sampling stations of water and sediment (1-7) within the Capibaribe Estuarine System (CES). Shaded area: Mangrove Park. STP: Cabanga Sewage Treatment Plant; USD: Untreated Sewage Disposal; Dashed circle: area corresponding to the estuarine turbidity maximum (ETM)...	95
Figure 2 –	Boxplot with particulate matter in suspension (SPM, mg L ⁻¹) (A) and particulate organic carbon (POC, %) (B) in waters from Capibaribe Estuary System – NE Brazil, during the dry and wet seasons. Black dots: outlier.....	102
Figure 3 –	Boxplot of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS, mg L ⁻¹) in water	

	samples from Capibaribe Estuary System collected at 7 stations during dry (October to December/2022) and wet (April to June /2022) seasons. Black dot: outlier. DS: Dry season; WS: Wet season. Data in red means that they are statistically different.....	103
Figure 4 –	Total Linear Alkylbenzenes (Σ LAB) concentrations in sediments samples from Capibaribe Estuarine System collected from 7 stations during dry season (October/2020, data from Arruda-Santos et al., 2023) and wet season (June/2022)	105
	MANUSCRITO 3 - EFEITO SUBLETAL E LETAL DO SURFACTANTE DODECILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO LINEAR (C₁₂-LAS) E DO SEU PRECURSOR DODECILBENZENO LINEAR (C₁₂-LAB) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO <i>DANIO RERIO</i> UTILIZANDO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS	
Figura 1 –	Taxa de mortalidade para a fase embriolarval de <i>Danio rerio</i> exposto por 96 hpf a diferentes concentrações de C ₁₂ -LAS. CL20 (9,30 ± 0,60 mg L ⁻¹) e CL50 (11,05 ± 0,34 mg L ⁻¹) calculada por ajuste dos dados segundo o modelo logístico. n = 20 embriões expostos em cada tratamento.....	130
Figura 2 –	(A) Índice de desenvolvimento morfológico “GMS” da fase embriolarval de <i>Danio rerio</i> exposta por 96 h a concentrações crescentes de C ₁₂ -LAS (Kruskal-Wallis H=101,41, p < 0,001, Dunn, p < 0,05) (B) GMS da fase embriolarval de <i>Danio rerio</i> exposta por um período de 0 a 96 h em concentrações crescentes de C ₁₂ -LAB (Kruskal-Wallis H=94,58 p < 0,001, Dunn p < 0,05). As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente. (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. C: Controle e C.S: Controle do solvente. n = 20 embriões expostos em cada tratamento.....	131
Figura 3 –	Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de	

	<i>Danio rerio</i> (n=10) expostas a concentrações crescentes de C ₁₂ -LAS e C ₁₂ -LAB. (A) Frequência cardíaca das larvas em 48 hpf expostas ao C ₁₂ -LAS (Kruskal-Wallis H= 63,018 p < 0,001, Dunn p < 0,05) (B) Frequência cardíaca das larvas em 48 hpf expostas ao C ₁₂ -LAB (ANOVA F = 11,957 p < 0,001, Dunnett p <0,05) (C) Frequência cardíaca das larvas em 72 hpf expostas ao C ₁₂ -LAS (Kruskal-Wallis H= 61,082 p < 0,001, Dunn p < 0,05) (D) Frequência cardíaca das larvas em 72hpf expostas ao C ₁₂ -LAB (ANOVA F = 14,566 p < 0,001, Dunnett p < 0,05). (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (C). CS: Controle do solvente.....	134
Figura 4 –	(A) Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de <i>Danio rerio</i> 168 hpf expostos a concentrações crescentes de C ₁₂ -LAS.(ANOVA F = 0,745 p < 0,05) (B) Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de <i>Danio rerio</i> 168 hpf expostos a concentrações crescentes de C ₁₂ -LAB (ANOVA F = 3,285 p < 0,001, Dunnett p < 0,05) (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (C).....	135

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 –	Fórmulas estrutural e molecular, pontos de fusão (PF), ponto de ebulição (PE) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) dos alquilbenzenos lineares analisados no presente estudo.....	31
Tabela 2 –	Massa Molar (MM), Tempos de retenção (t_R), Íons de quantificação (Q) e Íons de confirmação (C1,C2 e C3) dos LABs de interesse.....	48
Tabela 3 –	Padrões de LABs adquiridos pela Sigma-Aldrich indicando seus respectivos grupos, grau de pureza e número CAS.....	52
Tabela 4 –	Resultados da precisão em termos de repetitividade (%CV) do método e a exatidão representado pela variação percentual de recuperação (%) referente à análise das amostras fortificadas com 3 diferentes níveis de concentração dos LABs no sedimento.....	55
Tabela 5 –	Volumes da solução estoque retirados para as soluções padrões.....	59

MANUSCRITO 1 - SEWAGE CONTAMINATION ASSESSMENT IN AN URBANIZED TROPICAL ESTUARY IN NORTHEAST BRAZIL USING ELEMENTAL, ISOTOPIC AND MOLECULAR PROXIES

Table 1 –	Sediment characteristics based on granulometric distribution, organic carbon (OC), total nitrogen (TN) and linear alkylbenzene concentrations (LAB), LAB internal-to-external ratios (I/E_n) and degradation rates (D_n) of LAB in samples from Capibaribe Estuarine System.....	73
Table 2 –	Total LAB concentrations (ng g^{-1} dry weight) in surface sediment samples collected from different locations.....	78

MANUSCRITO 2 - SEWAGE OUTFLOW AND CONTAMINATION BY LINEAR ALKYL BENZENES AND THEIR ANIONIC SURFACTANT IN A BRAZILIAN TROPICAL URBAN ESTUARY, DURING WET AND DRY SEASONS

Table 1 –	Sedimentary mud and organic carbon (OC) contents of samples	
-----------	---	--

collected during the dry season (DS) and wet season (WS). Group of samples according to localization in the Capibaribe Estuarine System (CES) (Arruda-Santos et al., 2023). Legend: ETM = estuarine turbidity maximum..... 104

MANUSCRITO 3 - EFEITO SUBLETAL E LETAL DO SURFACTANTE DODECILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO LINEAR (C₁₂-LAS) E DO SEU PRECURSOR DODECILBENZENO LINEAR (C₁₂-LAB) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO *DANIO RERIO* UTILIZANDO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

Tabela 1 –	Taxa de mortalidade (%) acumulada dos embriões e larvas de <i>Danio rerio</i> expostos a diferentes concentrações de C ₁₂ -LAS e C ₁₂ -LAB (mg L ⁻¹) após 96 hpf. C: Controle e C.S : Controle do solvente.....	129
Tabela 2 –	Frequência (%) de patologias registradas durante o desenvolvimento embriolarval de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição a diferentes concentrações de C ₁₂ -LAS (mg L ⁻¹)	132
Tabela 3 –	Frequência (%) de patologias registradas durante o desenvolvimento embriolarval de <i>Danio rerio</i> após 96h de exposição a diferentes concentrações de C ₁₂ -LAB (mg L ⁻¹)	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amostra
C	Íons de confirmação
CA	Controle Analítico
CES	Capibaribe Estuarine System
CO	Carbono Orgânico
CV	Coeficiente de Variação
D	Degradation
E	Isômeros Externos
ETE	Estações de Tratamento de Esgotos
ETM	Estuarine Turbidity Maximum
GC-MS	Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas
GC	Gas Chromatograph
GMS	Global Morphology Score
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPF	Horas pós-fertilização
I	Isômeros Internos
LAB	Linear Alkylbenzene / Aquilbenzeno Linear
LAS	Linear Alkylbenzene Sulphonate/Aquilbenzeno Sulfonato Linear
LD	Limite de Detecção / Limit of Detection
LQ	Limite de Quantificação / Limit of Quantification
MDS	Non-metric Multidimensional Scaling
MBAS	Methylene Blue Active Substances
MM	Massa Molar
MO	Matéria Orgânica
ND	Not Detected

NT	Nitrogênio Total
OC	Organic Carbon
OD	Oxigênio Dissolvido
OM	Organic Matter
PCA	Principal Component Analysis
PE	Ponto de Ebulição
PI	Padrão Interno
PF	Ponto de Fusão
POC	Particulate Organic Carbon
PS	Padrão Surrogado
PPCPs	Pharmaceuticals and Personal Care Products
PCB	Bifenila Policlorada
Q	Íons de quantificação
REC	Recuperação
RMR	Região Metropolitana do Recife
SE	Solução Estoque
SERC	Sistema Estuarino do Rio Capibaribe
SM	Supplementary Material
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento
SPM	Suspended Particulate Matter
ST	Solução Trabalho
STP	Sewage Treatment Plants
TN	Total Nitrogen
T _R	Tempo de retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNEP	Un Environment Programme
UV-VIS	Espectroscopia ultravioleta visível

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
2.1	ESTUÁRIOS	26
2.2	MARCADORES ELEMENTARES E ISOTÓPICOS.....	27
2.3	MARCADORES MOLECULARES.....	28
2.3.1	Alquilbenzeno linear (LAB)	28
2.3.2	Alquil benzeno sulfonato linear (LAS)	31
2.4	PEIXES COMO BIOINDICADORES	34
2.4.1	Danio rerio como modelo biológico	34
2.4.2	Índice de desenvolvimento morfológico	35
2.4.2.1	Destacamento da cauda	36
2.4.2.2	Formação dos somitos	36
2.4.2.3	Formação dos olhos.....	37
2.4.2.4	Movimento	38
2.4.2.5	Circulação.....	38
2.4.2.6	Batimento cardíaco.....	38
2.4.2.7	Pigmentação da cabeça e corpo.....	38
2.4.2.8	Nadadeira peitoral	39
2.4.2.9	Boca protusível.....	40
2.4.2.10	Eclosão	41
2.4.2.11	Extensão do saco vitelínico	41
2.4.2.12	Insuflamento da bexiga natatória	42
2.5	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	43
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	45
3.1	HIPÓTESES	45
3.2	OBJETIVOS.....	46
3.2.1	Objetivo Geral	46
3.2.2	Objetivos específicos.....	46
4	IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIAS	47
4.1	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS LABS EM SEDIMENTOS.....	47
4.1.1	Otimização das condições cromatográficas (GC-MS) para análise dos LABs ...	47

4.1.2	Validação do método cromatográfico para análise de LABs em sedimento.....	50
4.1.2.1	Curva Analítica e Linearidade.....	51
4.1.2.2	Seletividade	53
4.1.2.3	Precisão	54
4.1.2.4	Exatidão.....	55
4.1.2.5	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método.....	55
4.1.3	Análises de LABs em amostras de sedimento	56
4.2	PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LAS EM ÁGUA ATRAVÉS DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO AZUL DE METILENO.....	56
4.2.1	Preparo das soluções	57
4.2.1.1	Solução estoque.....	57
4.2.1.2	Solução do azul de metileno.....	58
4.2.1.3	Solução de lavagem.....	58
4.2.2	Validação do método	58
4.2.2.1	Preparação da curva e linearidade do método	58
4.2.2.2	Precisão e exatidão	60
4.2.2.3	Limite de detecção (LD).....	60
4.2.3	Análises de LAS em amostras de água	61
4.3	CONTROLE DE QUALIDADE.....	61
4.3.1	Controle analítico	61
4.3.2	Branco.....	62
4.3.3	Amostras de sedimentos fortificadas	62
4.4	PROPOSTA DA TESE	63
5	MANUSCRITO 1: SEWAGE CONTAMINATION ASSESSMENT IN AN URBANIZED TROPICAL ESTUARY IN NORTHEAST BRAZIL USING ELEMENTAL, ISOTOPIC AND MOLECULAR PROXIES.....	65
6	MANUSCRITO 2: SEWAGE OUTFLOW AND CONTAMINATION BY LINEAR ALKYL BENZENES AND THEIR ANIONIC SURFACTANT IN A BRAZILIAN TROPICAL URBAN ESTUARY, DURING WET AND DRY SEASONS.....	92
7	MANUSCRITO 3: EFEITO SUBLETAL E LETAL DO SURFACTANTE DODECILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO LINEAR (C₁₂-LAS) E DO SEU PRECURSOR DODECILBENZENO LINEAR (C₁₂-LAB) NO	

	DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO <i>DANIO RERIO</i>	
	UTILIZANDO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E	
	COMPORTAMENTAIS	122
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146
	REFERÊNCIAS	148

1 INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico próximo a ambientes aquáticos, especialmente em áreas estuarinas e costeiras, é um padrão histórico no Brasil e isto é favorecido pelo potencial turístico e econômico desses locais (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2000). No entanto, essa preferência da população tem ocasionado uma forte pressão sobre o equilíbrio natural desses sistemas, tornando-os vulneráveis, o que causa preocupação crescente a todos que se beneficiam direta ou indiretamente desses ambientes (MARTINS *et al.*, 2008).

As maiores fontes de poluição para o ambiente aquático são os efluentes municipais, que podem ser domésticos e industriais (MARTINS *et al.*, 2008). Embora a proporção desses dois tipos seja variável, os efluentes domésticos constituem o principal contribuinte antrópico (WEAR *et al.*, 2021). O lançamento de esgotos domésticos na costa brasileira, com ou sem tratamento prévio, é um dos mais frequentes tipos de impacto negativo em áreas com acelerado crescimento da população, urbanização descontrolada e sem infraestrutura que suporte esse desenvolvimento (MARTINS *et al.*, 2008). A disposição de esgoto ou do lodo de esgoto nesses ambientes pode ocasionar impactos para a vida marinha, modificando a biodiversidade e o equilíbrio do ecossistema marinho devido à população microbiana exógena, a concentração alterada de nitrogênio e fósforo, e a deposição de resíduos sólidos nos sedimentos marinhos (ANDERSSON *et al.*, 2016). Além disso, o esgoto introduz contaminantes como metais, hidrocarbonetos, fármacos, etc., que podem provocar impactos no ambiente em diferentes níveis de organização biológica (JEZIERSKA *et al.*, 2009; TORREIRO-MELO *et al.*, 2015; MRDAKOVIC *et al.*, 2016; WU; DING, 2016; YANG *et al.*, 2020).

Além destes, um novo grupo de poluentes orgânicos tem sido detectado em amostras ambientais após aporte de efluentes domésticos, conhecidos como contaminantes emergentes. Tais substâncias têm causado considerável preocupação, pois além de sua ocorrência extensiva, potencial de toxicidade para a biota e riscos à saúde humana, ainda não possuem regulamentação legal ou níveis máximos toleráveis (SÓDRE *et al.*, 2010; IDE *et al.*, 2013). Nesse grupo de poluentes encontramos os Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal (em inglês Pharmaceuticals and Personal Care Products - PPCPs) que incluem analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, os detergentes e demais produtos de limpeza (MOMPELAT *et al.*, 2009; RAMPRASAD; PHILIP, 2016; NIU *et al.*, 2016).

A identificação da contaminação por esgotos urbanos em ambientes costeiros e marinhos é geralmente realizada através de indicadores microbiológicos, como os coliformes fecais, devido ao baixo custo e sua relativa confiabilidade, facilidade e rapidez de análise (GRIFFIN *et al.*, 2001; LIM *et al.*, 2017). Entretanto, o uso desses organismos apresentam algumas limitações, pois possuem reduzido tempo de vida e baixa resistência às variações ambientais como temperatura, radiação solar, salinidade, nutrientes entre outros, conferindo-lhes fragilidade nos resultados obtidos (FROEHNER; MARTINS, 2008; BYAPPANAHALLI *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2017). Dessa forma, a detecção de esgoto no ambiente através da investigação de outros indicadores, como os marcadores moleculares, surge como uma melhor alternativa trazendo um diagnóstico ambiental mais realista em relação à introdução e contaminação por esses efluentes (PETERS *et al.*, 2005).

Dentre os marcadores orgânicos moleculares amplamente relacionados à contaminação ambiental e utilizados no mapeamento de esgotos domésticos estão os alquilbenzenos lineares (LABs) (ISOBE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012; RINAWATI *et al.*, 2012; MAGAM *et al.*, 2016; ALKHADHER *et al.*, 2020) e os alquilbenzenos sulfonatos lineares (LAS) (MAHMOUD, 1998; GONZÁLEZ-MAZO *et al.*, 2002; CORADA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; OKBAH *et al.*, 2013). No Brasil, estudos utilizando esses marcadores ainda são muito escassos, e se concentram na região sul e sudeste (CETESB, 1978; AIDAR *et al.*, 1997; SILVEIRA *et al.*, 1982; EICHHORN *et al.*, 2002; MEDEIROS E BICEGO, 2004a,b; MEDEIROS *et al.*, 2005; DAUNER; MARTINS, 2015; MARTINS *et al.*, 2008; HERNANDES, 2009; MARTINS *et al.*, 2010, SASAKI, 2012; MARTINS *et al.*, 2014; DAUNER; MARTINS, 2015; CABRAL; MARTINS, 2018; CABRAL *et al.*, 2018).

Entretanto, somente as análises químicas comumente realizadas não são capazes de distinguir as substâncias e as concentrações que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente, sendo, portanto, insuficientes para avaliar o potencial risco ambiental dos contaminantes. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes ecotoxicológicos se apresentam como ferramentas importantes na detecção de efeitos deletérios desses contaminantes sobre a biota local. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam e se tornam extremamente necessários em uma avaliação ambiental (COSTA *et al.*, 2008).

Segundo dados divulgados pelo Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento (SNIS), apenas 55,8% dos brasileiros têm acesso à rede de esgoto no país, ou seja, quase 100 milhões de brasileiros não tem acesso a este serviço (SNIS, 2021). E, ainda, do esgoto

coletado, apenas 51,2% passam por tratamento (SNIS, 2021). Vale ressaltar que há disparidades regionais no Brasil, sendo as regiões mais críticas Norte e Nordeste. No Norte do país apenas 14% da população tem o esgoto coletado e 20,06% do esgoto tratado; no Nordeste, apenas 30,02% dos nordestinos tem acesso à coleta de esgotos, com um índice de tratamento de 35,05% (SNIS, 2021). Grande parte da região costeira brasileira não possui redes de coleta e sistemas de tratamento de esgotos e, quando existem, são ineficientes e/ou tratamentos primários. A falta de tal serviço faz com que boa parte das descargas de esgotos cheguem aos ambientes estuarinos e baías, através de córregos e canais, onde são lançados *in natura*, afetando diretamente a saúde pública e o meio ambiente (LAMPARELLI *et al.*, 2001; CETESB, 2007).

Dentre as regiões costeiras de Pernambuco mais afetadas pelo lançamento de esgotos domésticos, destaca-se o Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), localizado na Região Metropolitana do Recife (RMR) (PE). Atualmente, no Ranking do Saneamento Básico do Brasil, a cidade do Recife ocupa a 78ª posição, considerando as 100 maiores cidades do país, com uma taxa de atendimento total de esgoto produzido em torno de 44% (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2023). Sendo assim, a falta de um plano de saneamento básico efetivo causado principalmente pelo crescimento desordenado e acelerado dos centros urbanos localizados no entorno desse ambiente estuarino, resulta no despejo indevido de esgotos domésticos *in natura* nos corpos d'água, que é evidenciado pelas inúmeras galerias de esgoto presentes ao redor desse sistema (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2016). Isto tem gerado um aumento da concentração de matéria orgânica, nutrientes e outros compostos poluentes, que promovem a degradação ambiental do mesmo (FERNANDES *et al.*, 1999; SANTIAGO *et al.*, 2010; FLORES-MONTES *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014a; MACIEL *et al.*, 2015a;b; MACIEL *et al.*, 2016).

Diante disso, o presente estudo buscou avaliar a contaminação do SERC por esgoto doméstico, através de marcadores específicos tais como LAB e LAS, em matrizes de sedimento e água, respectivamente, nos diferentes períodos do ano (seco e chuvoso). Além disto, este trabalho avaliou os efeitos letais e subletais desses compostos sobre a espécie de peixe *Danio rerio*, através de biomarcadores morfológicos e comportamentais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ESTUÁRIOS

A região costeira é uma zona de transição entre o continente e o oceano, desempenhando papel importante na ligação e nas trocas entre tais ambientes (THURMAN, 1999). É uma área que abriga alguns dos mais produtivos e valorizados habitats do mundo, no qual estão inclusos os estuários.

Os estuários são comumente descritos como corpos d'água parcialmente fechados com livre conexão com o oceano, onde as águas doces provenientes das drenagens continentais se misturam com as águas do mar (PRITCHARD, 1967; FAIRBRIDGE, 1980; BIANCHI, 2007). Conforme a salinidade e maré, o sistema estuarino pode ser dividido em três setores: (1) estuário superior, com salinidade menor que 0,5 – região influenciada pela maré apenas na preamar; (2) médio estuário, com variação de salinidade entre 0,5 e 30 – região onde há mistura das águas fluviais e marinhas; (3) estuário inferior com salinidade acima de 30 devido à maior proximidade com o oceano (MIRANDA *et al.*, 2002).

Os ambientes estuarinos são caracterizados pela elevada concentração de sedimentos e nutrientes, que facilitam a produtividade biológica e a diversidade de habitats e de espécies, tornando-os extremamente interessantes do ponto de vista socioambiental (PROBIOEA, 2011). A condição hidrodinâmica favorável desses locais, mais protegido de ondas e correntes, também desperta o interesse do homem para a ocupação em suas proximidades e construção de terminais portuários que, por sua vez, estimulam o desenvolvimento de cidades (BLOT, 2003; PISANI *et al.*, 2013). A intensificação antrópica nesses ambientes muitas vezes os transformam em receptores dos resíduos gerados pelas atividades doméstica, industrial e/ou comercial, contribuindo com lançamentos de contaminantes nos corpos d'água, que podem provocar desequilíbrio ecológico e interferir nos serviços ecossistêmicos oferecidos por esses locais (MIRANDA *et al.*, 2002). Além disso, estuários impactados pelo homem recebem nutrientes e aporte de matéria orgânica (MO) de fontes antrópicas, aumentando a produção primária, que pode desencadear o processo de eutrofização. Tal processo pode resultar em graves problemas ambientais, tais como a depleção de oxigênio dissolvido (OD) na água, perda da biodiversidade e a liberação de CO₂ na atmosfera (MCCLELLAND; VALIELA, 1998; FLORES MONTES *et al.*, 2011).

Além da MO proveniente das fontes antrópicas (e.g. efluentes domésticos e industriais), os estuários urbanos também recebem MO de origem natural, provenientes de fontes alóctones, que podem ser terrestres (e.g. plantas terrestres) e marinhas (e.g. fitoplâncton marinho), e fontes autóctones (e.g. fitoplâncton estuarino) (BOUILLON *et al.*, 2011). Assim, os estuários exibem um padrão característico de mistura de MO de fontes naturais e antrópicas, que estão em constante transformação, podendo formar diferentes compostos de acordo com a velocidade de degradação e das variáveis bióticas e abióticas locais (GEARING, 2013).

Dessa forma, diante da crescente interferência do homem, múltiplos marcadores geoquímicos como os elementares, isotópicos e moleculares estão sendo comumente utilizados em estudos científicos para inferir a origem da MO e investigar o estado trófico em ambientes estuarinos (CANUEL; HARDISON, 2016; CABRAL *et al.*, 2018). Estes métodos diferem basicamente quanto ao nível de descrição da composição da MO e na especificidade quanto à fonte, se terrestre ou marinha, por exemplo (BIANCH; CANUEL, 2011).

2.2 MARCADORES ELEMENTARES E ISOTÓPICOS

A origem predominante da MO em estuários eutróficos tem sido amplamente avaliada por marcadores elementares tais como a razão estequiométrica entre os percentuais de carbono orgânico (CO) e nitrogênio total (NT) – razão (C/N)_a, e marcadores isotópicos como a razão entre a abundância dos isótopos estáveis do carbono (¹³C e ¹²C), normalmente expressa utilizando a notação delta ($\delta^{13}\text{C}$) (SIQUEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014a, COSTA *et al.*, 2021a). Isto é possível principalmente porque o teor de nitrogênio orgânico na MO depende de onde ela foi produzida e suas fontes de carbono apresentam assinaturas isotópicas específicas, permitindo assim sua identificação e distinção (TAZIOLI; TAZIOLI, 2005; BARCELLOS; FURTADO, 2006; BENBOW *et al.*, 2008). Em um ambiente estuarino impactado é possível destacar quatro principais fontes de MO: Plantas superiores C3 [razão (C/N)_a ≥ 20 (MEYERS, 1997), $\delta^{13}\text{C}$ de -30 a -24‰ (BOUILLON *et al.*, 2011)]; fitoplâncton marinho [razão (C/N)_a $\approx 6,6$ (SCHNEIDER *et al.*, 2003), $\delta^{13}\text{C}$ de -23 a -19‰ (BOUILLON *et al.*, 2011)]; fitoplâncton estuarino [razão (C/N)_a $\approx 6,2$ (COSTA *et al.*, 2021a), $\delta^{13}\text{C}$ de -35 a -21‰ (BOUILLON *et al.*, 2011)]; e o esgoto doméstico [razão (C/N)_a ≈ 10 (THORNTON; MCMANUS, 1994; COSTA, *et al.*, 2021a), $\delta^{13}\text{C}$ de -28 a -16‰ (DEBRUYN; RASMUSSEN, 2002; ROGERS, 2003; SOPHONSIRI; MORGENROTH, 2004; HUANG *et al.*, 2020;

COSTA *et al.*, 2021a). Apesar da especificidade desses marcadores, é possível observar sobreposição de assinaturas isotópicas, como é o caso, por exemplo, do fitoplâncton marinho ($\delta^{13}\text{C}$ de -23 a -19‰) e do esgoto ($\delta^{13}\text{C}$ de -28 a -16‰). Dessa forma, torna-se necessária a utilização de marcadores mais específicos como os moleculares para se ter uma identificação e quantificação mais precisa das contribuições de cada fonte.

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Devido à ampla distribuição e abundância de contaminantes presentes nas matrizes ambientais (água, sedimento, biota e ar), principalmente nos ambientes marinhos e costeiros, muitos estudos têm sido realizados, com a finalidade de identificar e quantificar tais contaminantes (EGANHOUSE, 1997). Além disso, também é importante entender o comportamento, o destino e os efeitos desses compostos sobre o ecossistema, sendo portanto imprescindível relacioná-los com suas fontes e origens de contaminação. Diante dessa necessidade, se tornou frequente a utilização de marcadores moleculares, que são definidos como um grupo de compostos cujas estruturas estão ligadas à origens específicas, sendo estes relativamente estáveis no ambiente (PHILP, 1985; EGANHOUSE, 1997; PETERS *et al.*, 2005).

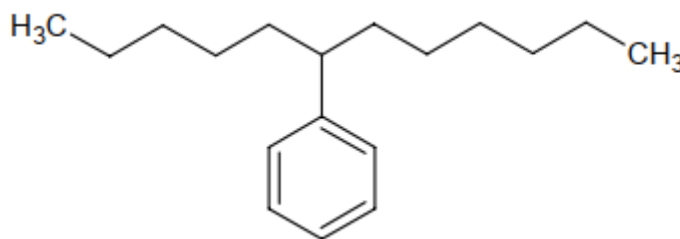
De acordo com sua origem, eles podem ser classificados como marcadores naturais ou antrópicos. Os marcadores naturais podem ser gerados por processos geoquímicos ou através da produção por organismos (BIANCHI; CANUEL, 2011), enquanto os marcadores antrópicos são produzidos por atividades humanas e introduzidos intencionalmente ou não, nos diversos compartimentos ambientais (BIANCHI; CANUEL, 2011). No presente estudo, os marcadores moleculares utilizados foram os LABs e os LAS, que são classificados como bons marcadores moleculares da introdução de esgotos domésticos, mais especificamente de detergentes, sendo possível as suas quantificações, mesmo em baixas concentrações (TAKADA EGANHOUSE, 1998; GONZÁLEZ-MAZO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2010; CORADA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2014).

2.3.1 Alquilbenzeno linear (LAB)

Quimicamente, o LAB é um composto orgânico cuja fórmula molecular pode ser expressa como n-C_m, onde ‘m’ indica o número de átomos de carbono alquilado e ‘n’ indica a

posição do radical fenil na cadeia alquil (Figura 1) (TAKADA; EGANHOUSE, 1998; MACÍAS-ZAMORA; RAMÍREZ-ALVAREZ, 2004).

Figura 1 - Formúla estrutural de um alquilbenzeno linear (6-C₁₂-LAB)

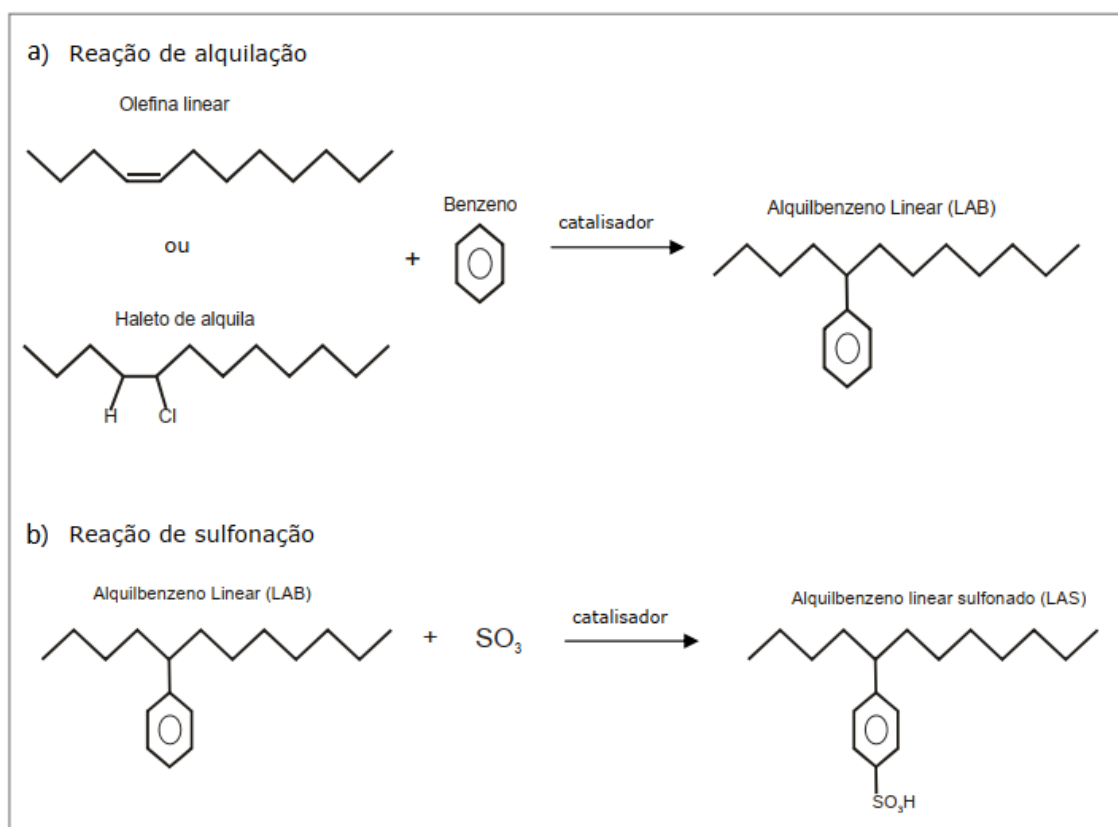


Fonte: Hernandez (2009).

Introduzido no início da década de 1960 como matéria-prima para produtos de limpeza, os LABs substituíram o alquilbenzenos sulfonatos (ABS) de cadeia ramificada que possuem alta resistência a biodegradação em ambiente aquático. Os alquilbenzenos de cadeias lineares se tornaram preferíveis devido ao baixo custo e menor impacto ambiental, sendo atualmente o grupo dos surfactantes aniônicos mais consumido no mundo (PENTEADO *et al.*, 2006; PULIDINDI; PANDEY, 2017).

Os alquilbenzenos lineares são produzidos a partir da reação de alquilação de *Friedel-Crafts* do benzeno com olefinas lineares ou haletos de alquilas, utilizando catalisadores, tais como ácido fluorídrico (HF), cloreto de alumínio (AlCl₃), mistura de zeólitas e óxidos metálicos (ZENG *et al.*, 1997) (Figura 2). Estes compostos são subsequentemente transformados nos surfactantes LAS através de reação de sulfonação da cadeia alifática pela adição de agentes sulfonantes, tais como ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou trióxido de enxofre (SO₃) gasoso (Figura 2). Devido à sulfonação incompleta, os LAS contém entre 1 a 3% de LABs, sendo estes transferidos para os detergentes e liberados no meio aquático através da descarga de resíduos domésticos (PENTEADO *et al.*, 2006).

Figura 2 - Esquema das reações para obtenção do LAB e do LAS. a) reação de alquilação de uma olefina linear ou de um haleto de alquila resultando na formação do LAB. b) reação de sulfonação do LAB resultando na formação do LAS



Fonte: Souza (2009).

Os LABs, embora em proporções muito menores do que o LAS, em detergentes comerciais, são mais resistentes à degradação ambiental do que os seus correspondentes sulfonados (TAKADA *et al.*, 2004; JARDÉ *et al.*, 2005). Isto faz com que os LABs sejam encontrados amplamente no ambiente aquático, sendo estes preferencialmente estudados como marcadores do aporte de esgoto doméstico (TAKADA; EGANHOUSE, 1998; HARTMANN *et al.* 2000). Em relação à toxicidade desses compostos, estudos indicam que os LABs não apresentam grandes riscos à biota (GLEDHIL *et al.*, 1991; BINETTI *et al.*, 2000; OECD, 2002).

Os alquilbenzenos lineares com 10 a 14 carbonos na cadeia principal são os mais utilizados nas formulações de detergentes, e por isso também os mais estudados (Tabela 1). Estes compostos apresentam massa molecular que varia entre 218 a 274 g mol⁻¹, são líquidos em temperatura ambiente (Tabela 1), sem coloração, viscosos e apresentam características hidrofóbicas (log K_{ow} > 7; Tabela 1) que fazem com que os mesmos se associem ao material particulado e sejam depositados nos sedimentos de fundo e/ou sejam acumulados nos tecidos

biológicos (MAGAM *et al.*, 2016). Uma vez no ambiente, os LABs podem sofrer degradação microbiana aeróbia em alguns dias, e podem persistir por muitos anos sob condições anaeróbicas (HARTMANN *et al.*, 2000; VENKATESAN *et al.*, 2002). Assim, os LABs têm sido considerados marcadores úteis para rastrear o transporte de contaminantes de fontes pontuais e não pontuais, devido à sua estabilidade em sedimentos, e para avaliar os processos de biodegradação durante o transporte (CHALAUX *et al.*, 1995; LUO *et al.*, 2008; NI *et al.*, 2008, 2009).

Estes compostos podem ser classificados de acordo com a isomeria, que é determinada pela localização do grupo fenílico à cadeia carbônica (HARTMANN *et al.*, 2000). A ligação do grupo fenil nas posições 2, 3 ou 4 da cadeia linear configura os isômeros externos (E), e nas posições 5 ou 6 os isômeros internos (I) (EGANHOUSE *et al.*, 1983; TAKADA; ISHIWATARI, 1990; EGANHOUSE; SHERBLOM, 2001). A biodegradação de isômeros externos tende a ocorrer antes que a dos internos, de forma que a razão entre eles (I/E) permite estimar o nível de biodegradação dos LABs e, conseqüentemente, o tipo de esgoto despejado no ambiente (esgoto bruto vs efluentes com tratamento secundário) (TAKADA; ISHIWATARI, 1990; TSUTSUMI *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Fórmulas estrutural e molecular, pontos de fusão (PF), ponto de ebulição (PE) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) dos alquilbenzenos linear analisados no presente estudo

Nome	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	PE (°C)	PF (°C)	log K _{ow}
Decilbenzeno (1-C ₁₀ -LAB)		C ₁₆ H ₂₆	293	-14	7,38
Undecilbenzeno (1-C ₁₁ -LAB)		C ₁₇ H ₂₈	316	-5	8,14
Dodecilbenzeno (1-C ₁₂ -LAB)		C ₁₈ H ₃₀	331	3	8,65
Tridecilbenzeno (1-C ₁₃ -LAB)		C ₁₉ H ₃₂	-	10	9,36
Tetradecilbenzeno (1-C ₁₄ -LAB)		C ₂₀ H ₃₄	359	46	9,95

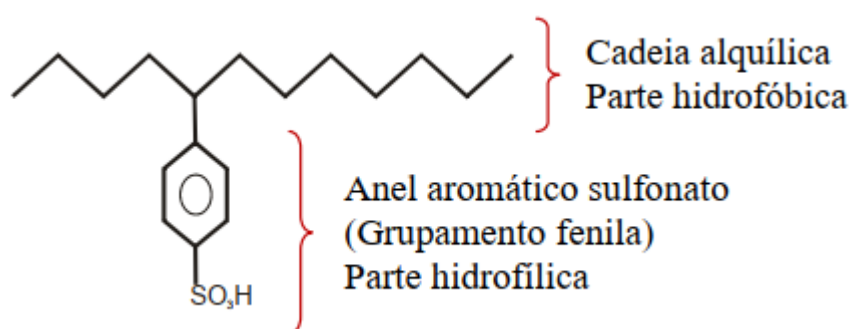
Fonte: A Autora (2023).

2.3.2 Alquil benzeno sulfonato linear (LAS)

As moléculas dos LAS (**Figura 3**) são constituídas por uma porção hidrofóbica, representada por uma cadeia alquílica, e uma hidrofílica, composta por um anel aromático

sulfonado. A cadeia alquílica pode variar de tamanho, com predominância de 10 a 14 átomos de carbono, o que caracteriza a existência de diferentes homólogos desse composto, sendo o LAS com 12 carbonos o principal representante deste grupo (RAND, 1995; ROMANELLI *et al.*, 2004). O anel aromático sulfonado pode se ligar à cadeia alquílica em qualquer posição, exceto nos carbonos terminais, determinando a existência de diferentes isômeros de LAS. Assim, o LAS comercial é constituído de uma mistura desses homólogos e isômeros em diferentes concentrações (CAVALCANTE *et al.*, 2014).

Figura 3 - Estrutura molecular de um alquilbenzeno sulfonato linear (5-C₁₂-LAS)



Fonte: Souza (2009).

Os LAS são os surfactantes aniônicos mais consumidos e de maior produção mundial (2,8 milhões t/ano), sendo o principal componente dos detergentes e demais produtos de limpeza (BÉRGE *et al.*, 2018). A sua utilização em uma extensa gama de formulações está ligada às suas excelentes propriedades de limpeza, boa solubilidade, elevado poder de espuma e seu baixo custo (PULIDINDI; PANDEY, 2017). No Brasil, o LAS apresenta alta comercialização, com cerca de 80 mil t/ano no mercado interno, sendo a DETEN (Camaçari, Bahia) a única fabricante de LAB e LAS no país (PENTEADO *et al.*, 2006). Essa produção representa aproximadamente 10% da fabricação mundial e coloca o Brasil entre os principais produtores mundiais (PENTEADO *et al.*, 2006).

O elevado consumo de LAS, tanto no setor industrial quanto doméstico, vem ocasionando o aumento de suas concentrações nos esgotos (1 a 18 mg L⁻¹) e, conseqüentemente, nas estações de tratamento de efluentes ou nos corpos hídricos (MUNGRAY; KUMAR, 2009; GRANATTO *et al.*, 2019). Devido a sua alta solubilidade e polaridade em água, este surfactante pode ser transportado por longas distâncias sendo,

portanto, considerado um bom indicador da contaminação recente por efluentes urbanos e da qualidade da água (HAMPEL *et al.*, 2012; CETESB, 2014).

A degradação desses compostos no ambiente acontece principalmente através do processo de biodegradação. A meia-vida para remoção natural de LAS, a partir de testes laboratoriais, em lodo de esgoto e águas fluviais varia entre 12 e 24 horas (LARSON *et al.*, 1993). No ambiente marinho e sistemas estuarinos a meia-vida varia entre 6 e 9 dias, provavelmente devido a menor atividade microbiana dessas áreas (LARSON *et al.*, 1993; LEON *et al.*, 2004). Após esse tempo é possível que ocorra a formação de compostos intermediários também xenobióticos (e.g. carboxilatos sulfofenílicos). A degradação do LAS em sistemas aeróbios apresentam níveis de remoção na ordem de 85 a 99% (PAINTER; ZABEL, 1989; GONZÁLEZ *et al.*, 2004; MORRAL *et al.*, 2006), tendo como produto final a formação de gás carbônico, água, sais minerais e biomassa (SCOTT; JONES, 2000). Nos sistemas anaeróbios esse percentual de remoção é bem mais baixo (cerca de 30%) e as reações químicas de degradação ainda não estão bem elucidadas (KRUEGER *et al.*, 1998; PENTEADO *et al.*, 2006).

As concentrações expressivas de LAS nos detergentes e a falta de tratamento adequado nas estações de tratamento de esgoto (ETEs) podem causar efeitos ambientais indesejáveis. A redução na concentração de elementos necessários para manutenção da vida aquática, tais como oxigênio dissolvido, a diminuição da penetração de luz eo aumento da concentração de xenobióticos como as bifenilas policloradas (PCBs) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por solubilização micelar, são alguns dos efeitos ambientais advindos das elevadas concentrações de LAS nos recursos hídricos (PENTEADO *et al.*, 2006). Além disso, elevadas concentrações de surfactantes ainda podem causar danos ao funcionamento e integridade da membrana plasmática de células vivas, provocadas pela redução na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólicos tóxicos, causada pela adsorção desses compostos na superfície celular (LEE, 1970; SHCHERBAKOVA *et al.*, 1999).

A toxicidade do LAS depende basicamente do comprimento de sua cadeia carbônica, sendo que, quanto maior o número de carbonos, mais tóxico ele é para os organismos aquáticos (HERA, 2007). A ação ecotóxica desse surfactante é vastamente descrita na literatura, podendo causar, por exemplo, a inibição de processos biológicos (JIFA *et al.*, 2006), danos no fígado (ALVAREZ-MUÑOZ *et al.*, 2009; VARSHA *et al.*, 2013), inibição de enzimas (MARIAPPAN; KARUPPASAMY, 2014; NKPONDION *et al.*, 2016), danos

celular (SANDBACK *et al.*, 2000), alteração na atividade cardíaca (RANA *et al.*, 2010) e efeitos comportamentais (BARBIERI *et al.*, 2000; CSERHÁTI *et al.*, 2002; BARBIERI *et al.*, 2005).

2.4 PEIXES COMO BIOINDICADORES

Os ecossistemas aquáticos são considerados ambientes altamente vulneráveis a poluição e contaminação por agentes tóxicos, provenientes na maioria dos casos do lançamento de esgotos, lixiviados agrícolas e resíduos industriais (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2015). Sendo assim, estudos ecotoxicológicos nessas áreas têm se mostrado uma importante ferramenta para analisar e prevenir possíveis impactos causados na biota ali presentes. Essa avaliação ocorre principalmente através do uso de organismos bioindicadores que devido a sua característica de pouca tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, podem apresentar alterações sejam fisiológicas, morfológicas e/ou comportamentais, quando expostos a algum desses contaminantes no meio que estão inseridos (LINS *et al.*, 2010).

Dentre os diferentes grupos de organismos utilizados como bioindicadores, destacam-se os peixes, por serem uma classe bastante diversa, refletindo diferentes modos de vida, com ampla distribuição geográfica e que apresentam modificações evolutivas, adaptativas e genéticas importantes, além da sua grande relevância econômica (DI GIULIO; HINTON, 2008; RAMSDORF *et al.*, 2012, TORREIRO-MELO *et al.*, 2015). Os efeitos ocasionados por contaminantes em peixes variam desde níveis celulares, como enzimáticas, imunológicas e genéticas, até efeitos em níveis mais elevados de organização biológica, como modificações histopatológicas, reprodutivas e comportamentais que podem comprometer as populações (PAYNE *et al.*, 2003).

2.4.1 *Danio rerio* como modelo biológico

Originário do sul da Ásia, a espécie de peixe *Danio rerio*, conhecido popularmente como paulistinha ou *Zebrafish*, é um teleósteo de água doce, pertencente à família *Cyprinidae* (SPENCE *et al.*, 2008). Indivíduos adultos desta espécie possuem comprimento em torno de 4 cm exibindo dimorfismo sexual, onde as fêmeas adultas apresentam uma coloração prateada e a região ventral maior, quando comparada aos machos (Figura 4A) (SIEBEL *et al.*, 2015). Os

machos se apresentam de forma mais alongada e em sua maturidade sexual são mais alaranjados (Figura 4B) (SIEBEL *et al.*, 2015). O ciclo de vida dessa espécie é de 2 a 4 anos com alta produção de ovos. Sua fecundação é externa, onde as fêmeas desovam em média 200 ovos a cada postura (SIEBEL *et al.*, 2015).

O *Danio rerio* é amplamente utilizado como modelo biológico em testes ecotoxicológicos devido à sua elevada sensibilidade durante seu desenvolvimento embrionário, permitindo a avaliação dos efeitos tóxicos dos contaminantes. Além disso, apresentam algumas vantagens como baixo custo e fácil manutenção, adultos de pequeno porte, rápido desenvolvimento, córion do ovo e embrião translúcidos, permitindo a observação das fases do desenvolvimento, além do amplo repertório de ferramentas desenvolvidas que descrevem atributos importantes da biologia desta espécie (SIMONETTI, 2014; SIEBEL *et al.*, 2015). Outro fator benéfico é a semelhança que existe entre o sistema nervoso do *Danio rerio* e do ser humano, fazendo com que cerca de 70% dos genes humanos sejam encontrados nessa espécie (HOWE *et al.*, 2013). Desta forma este modelo é amplamente utilizado em experimentos toxicológicos no âmbito da biomedicina e farmacologia (HOWE *et al.*, 2013).

Figura 4 - Exemplar do *Danio rerio* fêmea (a) e macho (b)



Fonte: Simonetti (2014).

2.4.2 Índice de desenvolvimento morfológico

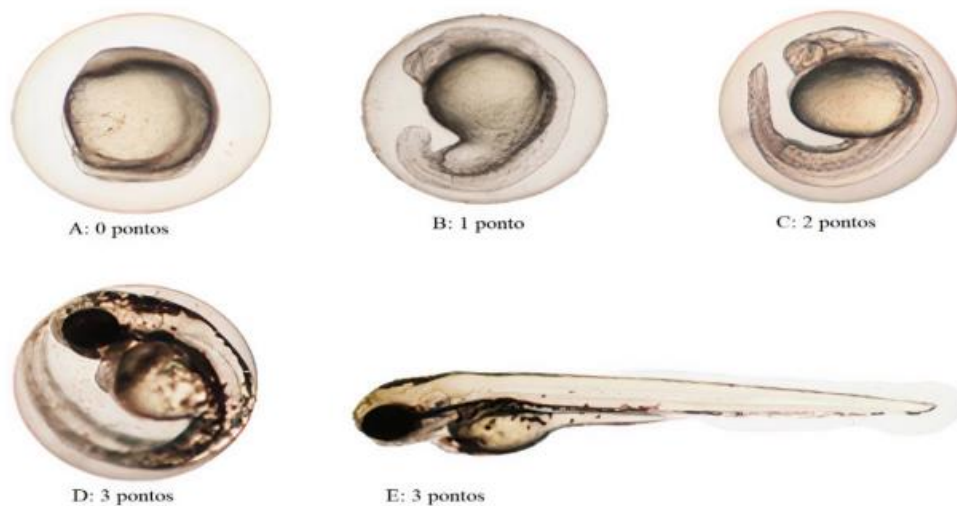
A fase inicial de desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* durante as primeiras 96h tem sido utilizada como um modelo importante na avaliação da toxicidade subletal de contaminantes isolados e de amostras ambientais complexas. Essa avaliação é comumente realizada através do índice integrado do desenvolvimento embrionário, denominado Global Morphology Score (GMS) (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Nesta abordagem, cada

embrião/larva é avaliado diariamente ao longo de 96h para análise do desenvolvimento de marcos morfológicos fundamentais, e são computados pontos ao longo deste período para cada marco morfológico verificado, sendo estes descritos em detalhes abaixo. Os indivíduos saudáveis devem ter uma pontuação igual a 18 pontos, incluindo o insuflamento da bexiga natatória (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

2.4.2.1 Destacamento da cauda

Nas primeiras 24 a 30 horas após a fertilização, embriões apresentando caudadestacada até a extensão do saco vitelínico recebem um ponto (Figura 5B). O mesmo ocorre quando a cauda se destaca além da extensão do saco vitelínico (Figura 5C) e para o desprendimento total da cauda a partir de 48 horas pós-fertilização (hpf) (Figura 5D), gerando a adição de mais 1 ponto em cada uma dessas situações (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 5 - Destacamento da cauda de indivíduos saudáveis da espécie *Danio rerio* 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

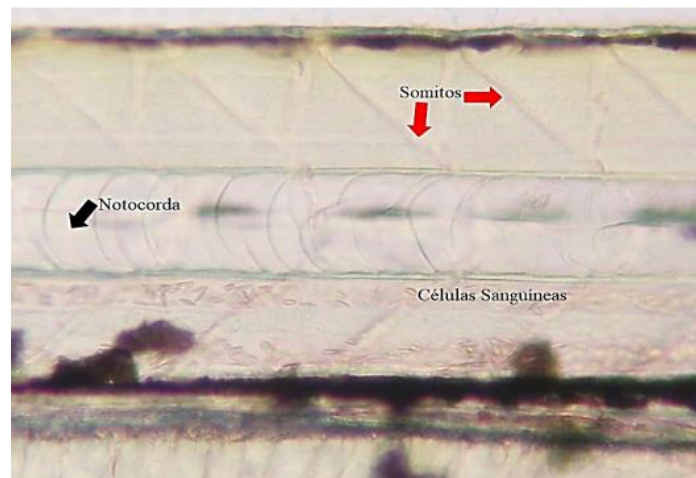


Fonte: Beekhuijzen *et al.*(2015) – adaptado.

2.4.2.2 Formação dos somitos

No segundo dia após a fertilização (24 hpf a 30 hpf), um ponto é atribuído para os embriões que apresentam somitos visíveis (Figura 6) (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 6 - Região dorsal do *Danio rerio* saudável com setas evidenciando os somitos já se diferenciando em Miótomos (Originando a musculatura dorsal) e Esclerótomo (Originará as vértebras em volta da notocorda). A notocorda em si destacada pela seta preta e as células sanguíneas em evidência

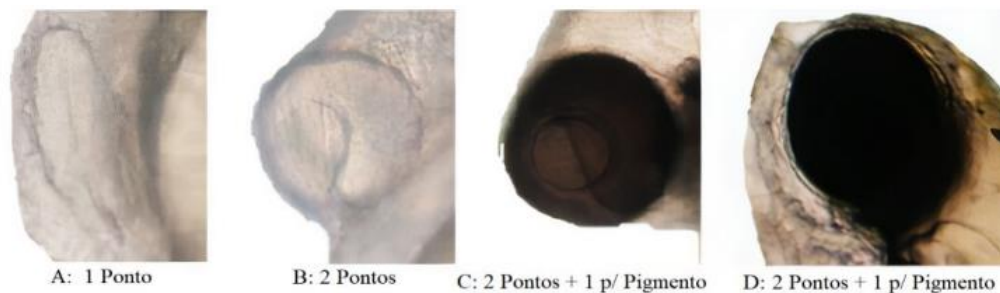


Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) - adaptado.

2.4.2.3 Formação dos olhos

A pontuação para olhos visíveis se estende até as 96 hpf. Quando os olhos são visíveis, mas planos, um ponto é atribuído (Figura 7A). Após o aparecimento de uma esfera, o desenvolvimento do olho é marcado com dois pontos (Figura 7B). A partir das 48 até as 96 hpf, se os olhos se apresentarem formados e completamente pigmentados (Figura 7C, D), será acrescido mais um ponto para esse marco morfológico (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 7 - Desenvolvimento do olho do *Danio rerio* saudável até as 96 hpf. 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



Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) - adaptado.

2.4.2.4 Movimento

Será atribuído um ponto em 24 hpf, quando o embrião/larva movimentar a cauda ou o corpo inteiro. Quando as nadadeiras peitorais se desenvolverem, o movimento das mesmas também deve ser considerado. O movimento pode ser espontâneo, ou estimulado com pipeta pasteur de plástico, mas sem tocar no embrião. O estímulo deve ser feito com a inserção de ar no volume da solução, criando um fluxo e bolhas no poço. Para a ausência de movimento será marcado 0 pontos ou, na presença de movimentos, 1 ponto (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

2.4.2.5 Circulação

Nas primeiras 24 hpf, quando for verificada a presença de circulação sanguínea recebe 1 ponto. No entanto, este ponto de desenvolvimento ficará mais evidente após a observação do batimento cardíaco, depois de 48 hpf (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

2.4.2.6 Batimento cardíaco

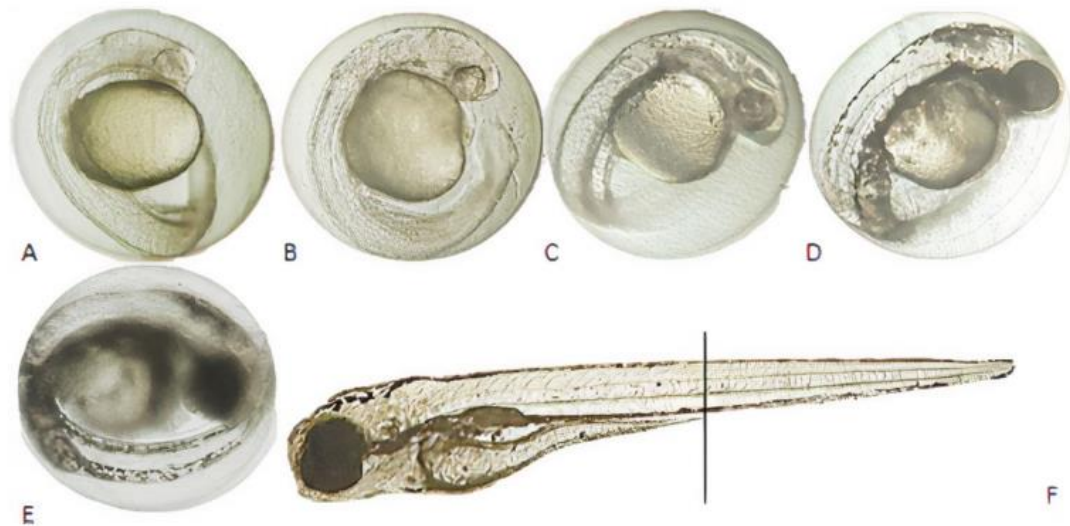
Em 48 hpf, será atribuído 1 ponto quando for observada a presença de batimento cardíaco. Quando não houver batimentos cardíacos visíveis, uma maior ampliação deve ser utilizada (cerca de 80x) para visualizar melhor a região do coração e permitir observar se há batimentos cardíacos, mesmo que sejam muito fracos. Essa observação deve ser feita durante pelo menos 1 minuto até que um ou mais batimentos consigam ser observados. Caso, ainda assim não sejam visualizados, é considerado ausente e é indicado a morte do embrião/larva (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

2.4.2.7 Pigmentação da cabeça e corpo

Em 72 hpf, será atribuído um ponto quando houver a presença de pigmentação da cabeça e do corpo (Figura 8), e mais um ponto para a presença de pigmentação da cauda. A pigmentação da cabeça e do corpo é avaliada como presente quando é possível visualizar o pigmento entre a cabeça e a extremidade do saco vitelínico. Enquanto que 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 até a cauda. A pigmentação da cabeça e do corpo é muitas vezes vista primeiro do que a pigmentação da cauda (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 8 - *Danio rerio* saudável entre 24 e 96 hpf com as imagens de A-F evidenciando o progresso na quantidade de massas pigmentadas escuras em todo o comprimento larval e nos olhos. A: 0 pontos. B, C, D: 1 ponto para cabeça e corpo. E: 1 ponto para pigmentação da cauda. F: diferenciação entre corpo e cauda



Fonte: Beekhuijzen *et al.*(2015) – adaptado.

2.4.2.8 Nadadeira peitoral

Em 72 hpf são verificadas a presença das nadadeiras peitorais (Figura 9), mesmo que apenas uma nadadeira esteja visível. As nadadeiras peitorais desenvolvem-se aproximadamente entre o coração e o fígado, estendendo-se posteriormente ao longo de cada lado da larva. A pontuação é reduzida quando há o desenvolvimento da nadadeira de apenas um lado após 96 hpf (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 9 - Desenvolvimento da nadadeira peitoral do *Danio rerio* saudável. A: 48 hpf. B: 72 hpf. C: 96 hpf



Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) – adaptado.

2.4.2.9 Boca protusível

A boca será pontuada entre 72 e 96 hpf. A presença da protrusível é marcada com 1 ponto quando a mandíbula inferior do embrião/larva atinge toda a extensão do olho, e com pontuação 2 quando a mandíbula inferior atinge a frente do olho ou mais (Figura 10). Quando a mandíbula inferior não for observada ou apenas atingir a região da pupila (metade dos olhos), é considerada como ausente (Figura 10) (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 10 - Desenvolvimento da boca no *Danio rerio* saudável. Mandíbula inferior ausente ou quando atinge apenas a metade do olho é atribuída pontuação 0; Mandíbula inferior atinge da metade do olho para frente recebe pontuação 1 (72 hpf); Mandíbula inferior atinge pelo menos até a frente do olho adquire pontuação 2



Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) – adaptado.

2.4.2.10 Eclosão

A eclosão deve acontecer nas 72 hpf, sendo lhe atribuído 1 ponto. Esta deve ser considerada apenas quando o embrião não estiver mais cercado pelo córion, sendo considerado larva a partir deste momento (Figura 11). Caso a eclosão aconteça antes ou depois das 72 hpf, o indivíduo não deve receber nenhuma pontuação no horário correspondente. Porém, essas informações devem ser anotadas, pois interferem na exposição, uma vez que a larva exposta (sem o córion) pode sofrer mais influência pelo contaminante.

Figura 11 - Eclosão da larva de *Danio rerio*. A: Pontuação 0 em 48 hpf. B: Pontuação 1 em 72 hpf (larva após eclosão)

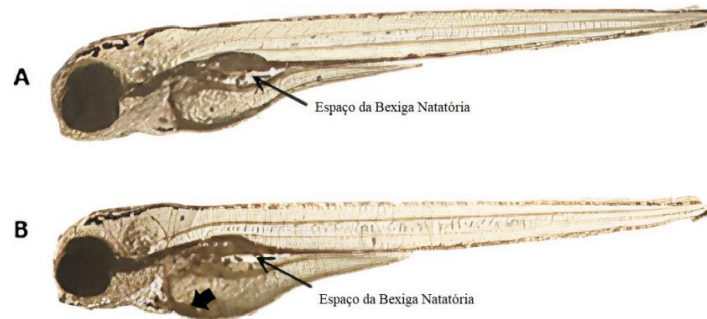


Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) – adaptado.

2.4.2.11 Extensão do saco vitelínico

As 96 hpf é atribuído 1 ponto para os indivíduos que absorveram o vitelo e 0 para os que não absorveram ou não completamente absorvido (Figura 12). A avaliação deste marco morfológico é feita através da espessura do saco vitelínico, que não deve exceder a região do coração, permitindo a visualização de um espaço onde a bexiga natatória ficará situada. A ausência da absorção do vitelo pode interferir no insuflamento da bexiga natatória, em razão de que o vitelo se estenderá para a região do coração, comprimindo a extensão do saco vitelínico de forma que não haverá espaço para o desenvolvimento da bexiga (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015).

Figura 12 - Extensão do saco vitelínico em organismos saudáveis entre 72 e 96 hpf. A: 1 ponto para extensão do saco vitelínico quase vazia (96 hpf). B: 0 pontos para quando o saco vitelínico excede o coração. Seta grossa indica saco vitelínico ultrapassando o coração. Setas finas mostram os espaços onde ficará a bexiga natatória

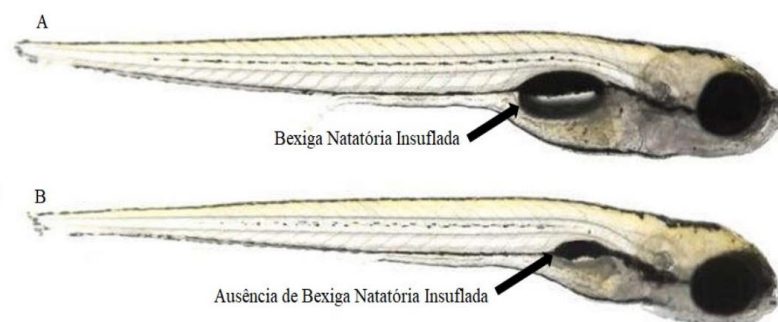


Fonte: Beekhuijzen *et al.*(2015) – adaptado.

2.4.2.12 Insuflamento da bexiga natatória

A bexiga natatória (Figura 13) tipicamente insufla no período entre 72 e 96hpf (HAGENAARS *et al.*, 2014), sendo essencial a absorção do saco vitelínico para que haja abertura do espaço onde se posiciona a bexiga, como dito anteriormente. Na proposta do GMS de Beekuijzen *et al.* (2015), não há a atribuição de pontos para avaliação do insuflamento da bexiga ao final das 96 hpf. Neste trabalho estamos acrescentando a avaliação deste marco morfológico, e a atribuição de 1 ponto quando a bexiga está insuflada ao final de 96hpf, totalizando um máximo de 18 pontos para uma larva perfeita ao final desse período.

Figura 13 - Insuflamento da Bexiga Natatória. A: Bexiga Natatória insuflada indicada pela seta. B: Bexiga Natatória não insuflada indicada pela seta



Fonte: Beekhuijzen *et al.* (2015) – adaptado.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Sistema estuarino do Rio Capibaribe (SERC) está inserido na Região Metropolitana do Recife (RMR), que abrange a capital do Estado de Pernambuco (Recife) e mais 14 municípios. Essa área é caracterizada por ser densamente urbanizada, sendo classificada como uma das três maiores aglomerações urbanas da Região Nordeste (IBGE, 2019). A RMR possui uma população de aproximadamente 3,7 milhões de habitantes, do qual Recife abriga quase a metade (1,6 milhões de habitantes) (IBGE, 2019).

O SERC é classificado como parcialmente misturado e está sujeito ao regime de marés semidiurnas, com alturas médias anuais de 1,6 m na maré de quadratura e de 2,6 m na maré de sizígia (SANTIAGO *et al.*, 2010; SCHETTINI *et al.*, 2016). O clima da região é caracterizado como tropical do tipo As' (úmido e quente) e apresenta dois padrões climáticos: período seco (setembro-fevereiro) e período chuvoso (março-agosto) (PARDAL *et al.*, 2019). A precipitação média é de 2.200 mm ano⁻¹ e a temperatura média anual é de 25,5 °C (INMET, 2020).

Esse sistema estuarino compreende o estuário do Rio Capibaribe e a Bacia do Pina (Figura 14). O Rio Capibaribe é o principal rio que perfaz o SERC, apresenta uma extensão de 240 km atravessando vários municípios centrais da RMR, e é considerado o 7º rio mais poluído do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2014a). Além disso, ele representa o principal aporte de água doce para o sistema, com vazão anual média de 11 m³ s⁻¹ (variando de 2 m³ s⁻¹ no período seco a 30 m³ s⁻¹ no período chuvoso (SANTOS, *et al.*, 2009; SCHETTINI *et al.*, 2016). A Bacia do Pina, que é parte integrante do SERC, é formada pela confluência do braço sul do Capibaribe com os rios Tejipió, Jordão e Pina (Figura 14). A mesma é considerada uma área rasa e larga, tendo cerca de 3 km de extensão e 500 m de largura (FEITOSA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2009). Outro contribuinte do SERC, não menos importante, é o Rio Beberibe, também considerado um dos rios mais poluídos do Estado, provavelmente devido ao déficit de saneamento básico das cidades que percorre, principalmente Olinda e Recife (OLIVEIRA *et al.*, 2014a). Em resumo, os rios formadores do SERC consistem essencialmente da drenagem urbana da RMR, fazendo desse sistema um corpo receptor de efluentes domésticos e industriais in natura (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2016).

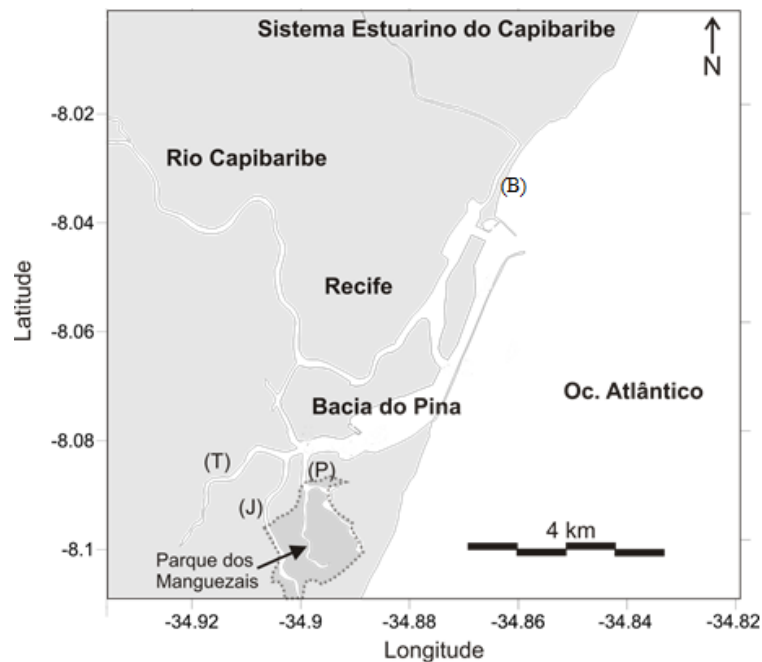
Na porção do baixo estuário do SERC se encontra a zona portuária do Recife, que abriga um dos portos mais importantes do país, o Porto de Recife. Este porto recebe navios para importação e exportação de cargas, navios cruzeiros turísticos, além de diversas

embarcações pequenas que levam turistas do Porto para o Parque das Esculturas Francisco Brennand, um ponto turístico muito frequentado (PORTO DO RECIFE, 2019). No entorno deste sistema, ainda estão situadas algumas marinas e locais de atracação para manutenção e reparo de barcos pesqueiros e de recreação, havendo assim um constante tráfego de embarcações.

Alguns estudos realizados no SERC reportaram a contaminação da área por metais (OLIVEIRA *et al.*, 2014b; SILVA, 2015; MACIEL, 2015; RÉGIS *et al.*, 2018), esteróis (FERNANDES *et al.*, 1999), hidrocarbonetos (FAVROD, 2012; CABRAL, 2014; MACIEL *et al.*, 2015a;b; MACIEL *et al.*, 2016; RÉGIS *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2021), organoclorados (MOURA, 2016) e biocidas antiincrustantes (MACIEL *et al.*, 2018; ALMEIDA, 2021). Como resultado da degradação ambiental, mudanças a nível ecológico em comunidades biológicas desta região foram reportadas (PARANAGUÁ, 2005; LIMA, 2006; VALENÇA, 2009; MACIEL, 2015). O Índice Biótico Marinho (AMBI) foi aplicado nesse sistema estuarino para testar a qualidade ambiental local e, numa escala de 0 a 7, a região apresentou um nível de distúrbio de 5,24, revelando que essa área se encontra fortemente poluída (VALENÇA, 2009). Além disso, na região do SERC também foram reportados elevados níveis de imposex em fêmeas de gastropódes, associados a presença de tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) (MACIEL *et al.*, 2018). Sedimentos do Capibaribe contaminados por diversos contaminantes como metais, HPAs, pesticidas clorados, dentre outros, foram relacionados com toxicidade em testes de laboratório aos náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis* (RÉGIS *et al.*, 2018). Mais recentemente, alterações no desenvolvimento embriolarval foram registrados em embriões/larvas da espécie de peixe *Danio rerio* expostos à águas coletadas na região do SERC, sendo este efeito associado a contaminação por hidrocarbonetos (ALVES *et al.*, 2021).

Apesar da intensa ação antrópica e visível degradação, ainda é uma região muito importante do ponto de vista ecológico e socioeconômico, visto que é utilizada para lazer (turismo), navegação, pesca de subsistência e/ou comercial, além de funcionar como berçário para diversas espécies marinhas (FEITOSA *et al.*, 1999; LIMA, 2006; MACIEL *et al.*, 2015a,b; ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2016).

Figura 14 - Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), PE, Brasil, e seus rios formadores: Rio Capibaribe, Rio Tejió (T), Rio Jordão (J), Rio Pina (P) e Rio Beberibe (B)



Fonte: Maciel *et al.* (2015a).

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESES

Hipótese 1: O esgoto apresenta uma contribuição relevante na composição da matéria orgânica sedimentar e do material particulado em suspensão na área do SERC;

Hipótese 2: O lançamento de esgotos domésticos no SERC contamina as águas e sedimentos com LAS e LABs, respectivamente, sendo as maiores concentrações registradas em áreas próximas à pluma de esgoto e durante o período seco;

Hipótese 3: Os LAS são potencialmente mais tóxicos que os LABs para a espécie de peixe *Danio rerio* durante sua fase embrionária e, em concentrações ambientalmente relevantes, podem causar danos aos organismos aquáticos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a contaminação do SERC por esgoto doméstico, através da determinação da concentração de moléculas marcadoras específicas, bem como os efeitos tóxicos destes compostos sobre a espécie de peixe *Danio rerio*.

3.2.2 Objetivos específicos

- Implantar e validar uma metodologia adequada para determinação de alquilbenzenos lineares (LABs) na matriz sedimento e alquilbenzenos sulfonatos lineares (LAS) na matriz água;
- Determinar as concentrações destes marcadores orgânicos moleculares em amostras de água (LAS) e sedimento (LABs) ao longo do SERC (Artigos 1 e 2);
- Determinar a origem predominante da matéria orgânica sedimentar bem como sua distribuição nos sedimentos do SERC (Artigo 1);
- Avaliar o grau de contaminação desse sistema estuarino por LAS e LABs (Artigos 1 e 2);
- Caracterizar possíveis variações da contaminação de LAS em água e LAB no sedimento em diferentes estações do ano (seco e chuvoso) (Artigo 2);
- Identificar as áreas mais contaminadas por LAS e LABs na área do SERC (Artigos 1 e 2);
- Avaliar os efeitos ecotoxicológicos da exposição do modelo biológico *Danio rerio* a concentrações comumente encontradas em áreas de lançamento de esgoto bruto, quantificando efeitos letais e subletais no desenvolvimento embriolarval, além do comportamento natatório espontâneo (Artigo 3).

4 IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIAS

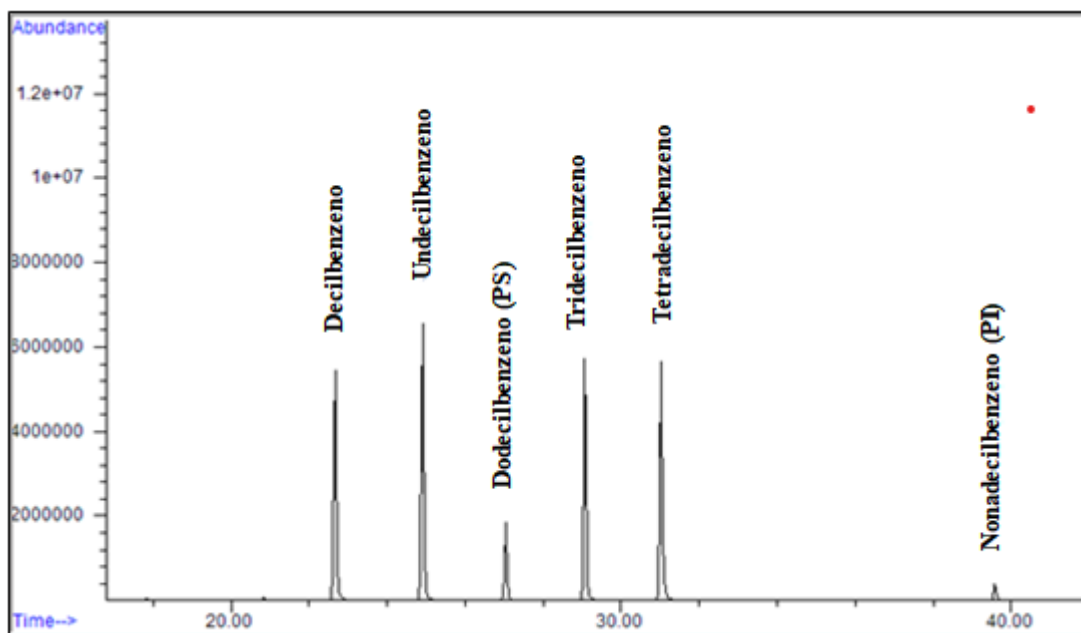
4.1 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS LABS EM SEDIMENTOS

O procedimento analítico adotado neste trabalho para as análises de sedimento dos LABs seguiram as metodologias descritas em UNEP (1992), Martins *et al.* (2010); Sasaki (2012); Martins *et al.* (2014) e Dauner e Martins (2015). Essa metodologia foi implantada e validada no Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR) da UFPE. O detalhamento de cada etapa dos procedimentos analíticos estão descritos nos itens a seguir.

4.1.1 Otimização das condições cromatográficas (GC-MS) para análise dos LABs

A primeira etapa para a implantação da metodologia dos LABs foi otimizar as condições de análise do cromatógrafo a gás. Inicialmente foi injetada uma solução (1000ng mL^{-1}) contendo uma mistura dos alquilbenzeno lineares (LABs) dissolvida em n-hexano, com os quatro compostos selecionados para estudo (decilbenzeno - 1-C₁₀-LAB, undecilbenzeno - 1-C₁₁-LAB, tridecilbenzeno - 1-C₁₃-LAB e tetradecilbenzeno - 1-C₁₄-LAB), o padrão surrogado (PS) (dodecilbenzeno - 1-C₁₂-LAB) e o padrão interno (PI) (nonadecilbenzeno - 1-C₁₉-LAB). A aquisição dos dados foi realizada primeiramente no modo de varredura (SCAN) para a identificação dos tempos de retenção e íons que seriam utilizados no modo de monitoramento de íons seletivos (SIM). Após escolhidos os íons de quantificação e confirmação de cada composto (Tabela 2), a mesma mistura contendo os padrões foi injetada (Figura 15) para a construção da curva analítica.

Figura 15 - Cromatograma obtido no GC-MS a partir da injeção de 1 µl da solução de mistura de LABs, no modo SIM



Fonte: A Autora (2023).

Tabela 2 - Massa Molar (MM), Tempos de retenção (t_R), Íons de quantificação (Q) e Íons de confirmação (C1, C2 e C3) dos LABs de interesse.

Analito	MM (g mol ⁻¹)	t_R (min)	Q (m/z)	C1 (m/z)	C2 (m/z)	C3 (m/z)
Decilbenzeno (1-C₁₀)	218	21,38	92	91	218	105
2-C ₁₀	218	19,65	105	91	106	218
3-C ₁₀	218	18,86	91	119	105	218
4-C ₁₀	218	18,45	91	133	105	218
5-C ₁₀	218	18,23	91	218	105	161
Undecilbenzeno (1-C₁₁)	232	23,61	92	91	105	232
2-C ₁₁	232	21,94	105	106	91	105
3-C ₁₁	232	21,12	91	119	105	105
4-C ₁₁	232	20,69	91	133	105	105
5-C ₁₁	232	20,46	91	147	105	105
6-C ₁₁	232	20,37	91	161	232	105
Dodecilbenzeno (1-C₁₂)	246	26,52	92	91	246	105
2-C ₁₂	246	24,01	105	106	91	246
3-C ₁₂	246	23,33	91	119	105	246

4-C12	246	22,86	91	133	105	246
5-C12	246	22,66	91	147	105	246
6-C12	246	22,53	92	105	161	246
Tridecilbenzeno (1-C₁₃)	260	28,55	92	91	260	105
2-C13	260	26,16	105	106	91	260
3-C13	260	25,41	91	119	260	105
4-C13	260	24,95	91	133	260	105
5-C13	260	24,71	91	147	260	105
7,6-C13	260	24,55	91	105	92	161
Tetradecilbenzeno (1-C₁₄)	274	30,48	92	91	274	105
2-C14	274	32,13	92	91	106	105
3-C14	274	32,05	92	91	119	105
4-C14	274	31,61	92	91	133	105
5-C14	274	31,46	92	91	147	105
7,6-C14	274	31,34	92	91	161	105
Nonadecilbenzeno (1-C₁₉)	344	39,87	92	91	344	105

Fonte: A Autora (2023).

A identificação e quantificação dos compostos foi realizada com a ajuda de um cromatógrafo a gás acoplado à um espectrômetro de massas (GC-MS) da Agilent Technologies, modelo 7820A e 5975C, respectivamente. A coluna utilizada foi a HP-5MS (25 m de comprimento, espessura do filme 0,25 μm e diâmetro interno 0,25 mm). O hélio (grau de pureza 99,999%) foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹ na coluna. A temperatura do injetor e da interface foram ajustadas para 300 °C, enquanto que a temperatura da fonte de íons e do quadrupolo foram 150 °C e 230 °C, respectivamente. A rampa de temperatura do forno seguiu a seguinte programação: temperatura inicial 40°C, 20°C/min até 60°C, 5°C/min até 290°C, isotérmico a 290°C por 5 min, 10°C/min até 300°C, permanecendo estável nesta temperatura por 10 min a fim de garantir que todos os compostos eluíssem de dentro da coluna. O tempo total de corrida foi de 63 minutos. O espectrômetro de massas foi operado com fonte de ionização por elétrons (energia de ionização: 70 eV; corrente de emissão: 300 μA).

Com a finalidade de não subestimar os resultados de LABs e analisar o grau de degradação desses marcadores no ambiente, os isômeros dos LABs também foram identificados e quantificados. São eles: 2-C₁₀-LAB, 3-C₁₀-LAB, 4-C₁₀-LAB, 5-C₁₀-LAB, 2-C₁₁-LAB, 3-C₁₁-LAB, 4-C₁₁-LAB, 5-C₁₁-LAB, 6-C₁₁-LAB, 2-C₁₂-LAB, 3-C₁₂-LAB, 4-C₁₂-LAB, 5-C₁₂-LAB, 6-C₁₂-LAB, 2-C₁₃-LAB, 3-C₁₃-LAB, 4-C₁₃-LAB, 5-C₁₃-LAB, 7;6-C₁₃-LAB, 2-C₁₄-LAB, 3-C₁₄-LAB, 4-C₁₄-LAB, 5-C₁₄-LAB, 6-C₁₄-LAB e 7-C₁₄-LAB. Uma amostra industrial de LAB fornecida pela empresa Deten® foi usada na identificação dos tempos de retenção de homólogos e isômeros.

Para a quantificação dos homólogos de LABs (C₁₀-LAB, C₁₁-LAB, C₁₂-LAB, C₁₃-LAB e C₁₄-LAB) foram empregados os seus respectivos isômeros com o radical fenila na posição do carbono 1 da cadeia alquílica (1-C₁₀-LAB, 1-C₁₁-LAB, 1-C₁₃-LAB e 1-C₁₄-LAB), uma vez que os outros isômeros não estão disponíveis comercialmente e, portanto, não é possível construir uma curva analítica com estes homólogos. Este procedimento é aceito cientificamente visto que todas as propriedades químicas dos homólogos de uma mesma série são semelhantes (MOSHER, 1992). Para os isômeros de C₁₂-LAB foi utilizada a área do homólogo 1-C₁₁-LAB (SASAKI, 2012).

4.1.2 Validação do método cromatográfico para análise de LABs em sedimento

O procedimento de validação de métodos deve abranger todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL *et al.*, 2008). Não há um consenso sobre a obrigatoriedade de parâmetros que devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, porém alguns documentos e artigos têm sido utilizados para orientar tais estudos (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020; PASCHOAL *et al.*, 2008).

No presente estudo, para a validação da metodologia, foram considerados os parâmetros de identificação e confirmação dos analitos de interesse: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico de demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020).

A seletividade está relacionada com a capacidade de um método em estabelecer, sem equívoco, o analito de interesse na presença de outros componentes, isto é, esse parâmetro

assegura que a resposta seja exclusivamente do analito de interesse do estudo (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, em condições definidas. Este parâmetro pode ser expresso por meio da repetitividade (INMETRO, 2020).

A exatidão/recuperação consiste na fortificação da amostra, ou seja, adição de uma solução analítica com diferentes concentrações definidas do analito de interesse, seguida da determinação da concentração do analito adicionado (LANÇAS, 2004).

Limite de detecção (LD) é definido como sendo a menor concentração de um analito que pode ser diferenciada com segurança do ruído do sistema (LANÇAS, 2004), enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2020).

4.1.2.1 Curva Analítica e Linearidade

Os padrões externos, surrogado e interno dos alquilbenzeno lineares (LABs), utilizados neste estudo, foram de altíssima pureza e foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) (Tabela 3).

As soluções estoque (SE) dos padrões individuais dos LABs foram preparadas com o solvente n-hexano, em concentrações finais de $1.000.000 \text{ ng mL}^{-1}$. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções trabalho (ST) dos compostos individuais, com uma concentração final de $100.000 \text{ ng mL}^{-1}$. A partir destas, foi preparada uma solução mista dos LABs com concentrações de 1000 ng mL^{-1} e de $100.000 \text{ ng mL}^{-1}$ de cada composto para posterior diluição e preparação das soluções da curva analítica. A curva analítica foi preparada com 9 níveis de concentração: $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$, 5 ng mL^{-1} , 50 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} , 500 ng mL^{-1} , 1000 ng mL^{-1} , 1500 ng mL^{-1} , 3000 ng mL^{-1} e 5000 ng mL^{-1} .

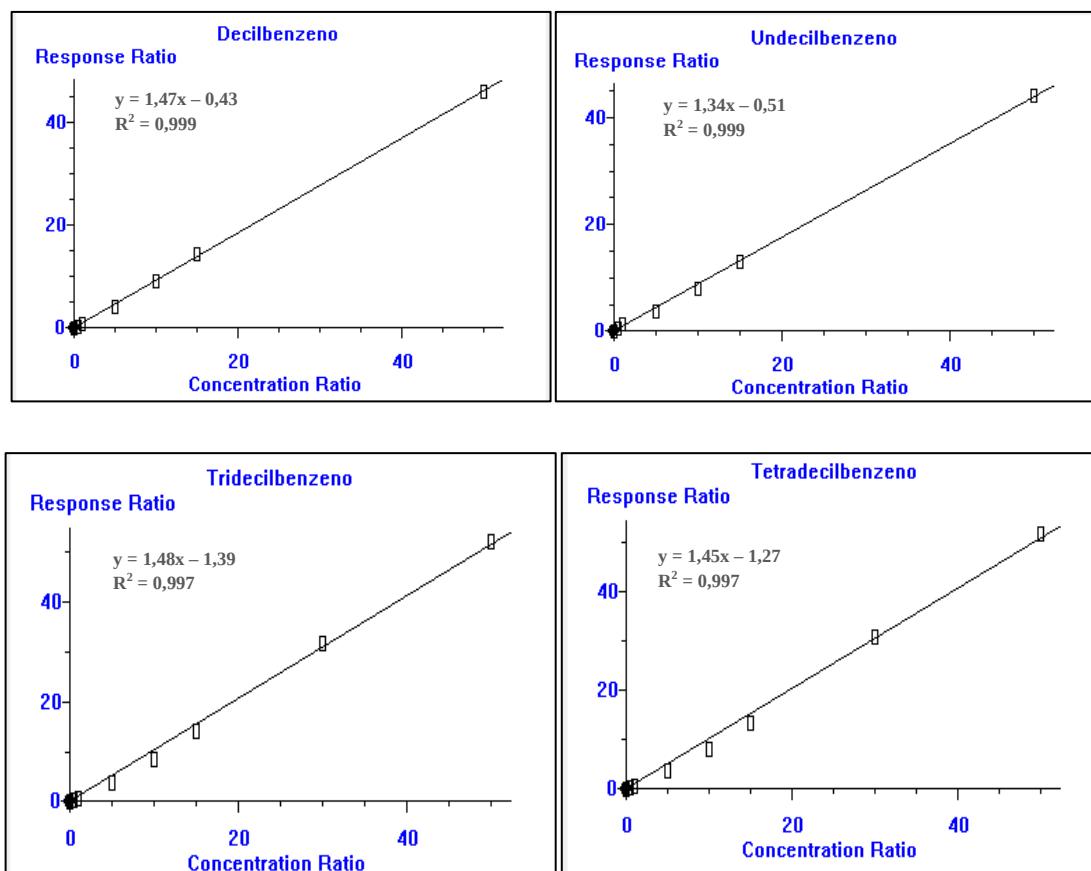
Tabela 3 - Padrões de LABs adquiridos pela Sigma-Aldrich indicando seus respectivos grupos, grau de pureza e número CAS.

Padrões	Função	Grupo	Pureza	NºCAS
Decilbenzeno (1-C₁₀)	Padrão Externo	LABs	≥99,5%	104-72-3
Undecilbenzeno (1-C₁₁)	Padrão Externo	LABs	99%	6742-54-7
Dodecilbenzeno (1-C₁₂)	Surrogado	LABs	99,5%	123-01-3
Tridecilbenzeno (1-C₁₃)	Padrão Externo	LABs	≥99,5%	123-02-4
Tetradecilbenzeno (1-C₁₄)	Padrão Externo	LABs	≥99,5%	1459-10-5
Nonadecilbenzeno (1-C₁₉)	Padrão Interno	LABs	≥97%	29136-19-4

Fonte: A Autora (2023).

A linearidade foi determinada utilizando-se o método matemático conhecido como análise de regressão linear. Foram determinados os coeficientes de regressão angular (a) e linear (b), bem como o coeficiente de correlação (R^2). Este último parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, uma vez que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. As curvas analíticas obtidas para cada analito mostraram coeficiente de correlação maior que 0,996 (Figura 16), indicando uma excelente correlação entre concentração e resposta analítica. Estes resultados evidenciam uma boa linearidade do método e sensibilidade do equipamento, o que permite a confiabilidade dos dados.

Figura 16 - Curvas analíticas obtidas no dia 30/03/2021 para o decilbenzeno, undecilbenzeno, tridecilbenzeno e tetradecilbenzeno, dentro da faixa de 2,5 a 5000 ng g⁻¹.

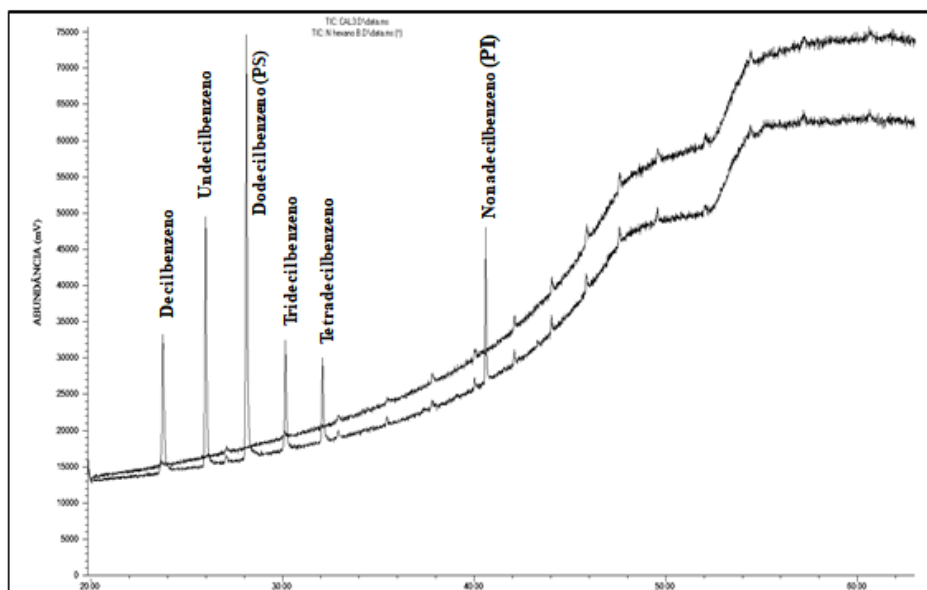


Fonte: A Autora (2023).

4.1.2.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada a fim de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja oriundo exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (CAVALCANTE, 2007). Para tanto, foi feita uma comparação dos cromatogramas do solvente e de um ponto da curva (50 ng g⁻¹) e, analisando a sobreposição dos cromatogramas observou-se a perfeita separação de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método, além da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção específicos dos analitos de estudo (Figura 17).

Figura 17 - Comparação entre os cromatogramas do solvente e do ponto da curva para os LABs.



Fonte: A Autora (2023).

4.1.2.3 Precisão

A precisão do método analítico foi determinada através de estudos de repetitividade, que consistiu na análise em triplicata de sedimentos fortificados, em 3 diferentes concentrações, a saber 50, 100 e 800 ng g⁻¹. As tréplicas de cada concentração foram extraídas em soxhlet, purificadas em coluna de sílica gel e alumina e analisadas no GC-MS (descrito com mais detalhes no item 4.1.3.). A precisão do método foi determinada calculando-se o coeficiente de variação (% CV) dos resultados encontrados para cada uma das amostras analisadas em triplicata (Equação 1) (INMETRO, 2020).

$$\%CV = \frac{s}{y} * 100 \quad (1)$$

Onde s é o desvio padrão das médias das concentrações obtidas e y é a média das concentrações.

Os valores de CV(%) encontrados para as amostras analisadas dentro da faixa de trabalho para os LABs estão abaixo de 20 % (Tabela 4), indicando uma boa precisão do método (RIBANI *et al.*, 2004).

4.1.2.4 Exatidão

O ensaio de recuperação é comumente utilizado para avaliar a exatidão do método, pois este reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Utilizando-se as mesmas amostras do item 4.1.2.3., a exatidão do método foi determinada para cada analito, no qual o percentual de recuperação foi calculado segundo a equação 2 (INMETRO, 2020):

$$\text{REC (\%)} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} * 100 \quad (2)$$

Os valores mínimos e máximos de recuperação (REC %), observados para cada LAB, foram entre 43 % e 120 % (Tabela 4), indicando que estes estão dentro dos limites aceitos para o teste da exatidão (40 a 120%) (DENOUX; WANG, 1998).

Tabela 4 - Resultados da precisão em termos de repetitividade (%CV) do método e a exatidão representado pela variação percentual de recuperação (%) referente à análise das amostras fortificadas com 3 diferentes níveis de concentração dos LABs no sedimento.

Compostos	Repetitividade (%CV)			Recuperação (%)		
	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	800 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	800 ng g ⁻¹
1-C₁₀-LAB	10,7	13,3	3,4	47-56	43-56	55-57
1-C₁₁-LAB	9,2	1,5	3,2	59-71	65-67	58-62
1-C₁₃-LAB	8,2	4,1	3,4	95-110	108-116	64-69
1-C₁₄-LAB	6,7	6,7	3,2	112-120	119-120	66-70

Fonte: A Autora (2023).

4.1.2.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método

Neste estudo, o limite de detecção foi considerado como três vezes o ruído da linha de base, sendo este visivelmente observado durante a integração dos picos cromatográficos. O limite de quantificação foi calculado dividindo o menor ponto da curva (2,5 ng mL⁻¹) pela massa extraída de cada amostra (15 g), resultando num valor de 0,17 ng g⁻¹ para todos os analitos.

4.1.3 Análises de LABs em amostras de sedimento

As amostras de sedimentos foram secas através do processo de liofilização, desagregadas e homogeneizadas em almofariz com pistilo de porcelana, e passadas em uma peneira granulométrica com malha de 500 μm . Uma alíquota de aproximadamente 15g de sedimento foi pesada de cada amostra, e adicionados 100 μL do padrão surrogado de LABs (1-C₁₂-LAB) com concentração de 1000 ng mL⁻¹.

As amostras foram submetidas à extração em sistema Soxhlet, utilizando uma mistura de 80 mL de diclorometano:n-hexano (1:1, v/v) por cerca de 8h. Durante a extração, também foram adicionados fios de cobre ativado ao solvente, para retirada do enxofre das amostras, um importante interferente nas análises.

Os extratos resultantes foram concentrados à 1 mL em um rotaevaporador e, posteriormente, foram submetidos à cromatografia de adsorção em uma coluna contendo 3,2g de sílica gel e 1,8g de alumina (5% desativadas). Os alquilbenzeno lineares (LABs), foram eluídos com 10 mL de n-hexano, posteriormente os extratos foram novamente concentrados até aproximadamente 1 mL e a eles foram adicionados 100 μL do padrão interno nonadecilbenzeno (1-C₁₉-LAB).

Na sequência, 1 μL de cada extrato foi injetado no cromatógrafo a gás (Agilent Technologies 7820A) acoplado a um detector de espectrometria de massas (Agilent Technologies 5975) - GC/MS. Os compostos analisados no GC-MS foram identificados através do tempo de retenção e pelo espectro de massas (razão m/z). A quantificação foi feita por razões entre os padrões surrogados e os compostos de interesse, baseadas nas curvas analíticas construídas.

4.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LAS EM ÁGUA ATRAVÉS DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO AZUL DE METILENO

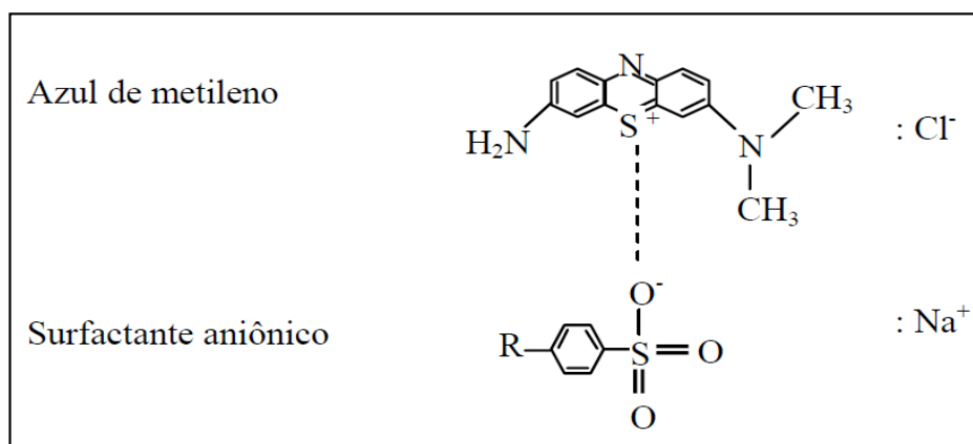
Os surfactantes aniônicos como o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) são conhecidos no contexto analítico como MBAS (Substâncias Ativas ao Azul de Metileno: “Methylene Blue Active Substances”) (GARDINGO, 2010). O método espectrofotométrico com o azul de metileno é comumente usado para determinar as concentrações de surfactantes aniônicos em águas e efluentes. Este método encontra-se normalizado segundo a ISO 7875-1:1996 e baseia-se na reação entre os surfactantes aniônicos

e o reagente catiônico azul-de-metileno, que se transfere, quando em equilíbrio, da solução aquosa para uma solução orgânica líquida imiscível, ocorrendo a formação do par iônico (surfactante aniônico/catião azul-de-metileno) (ABNT, 1989; APHA, 1998) (Figura 18). A intensidade da cor azul na fase orgânica indica a quantidade de surfactante aniônico existente na fase aquosa e é medida por Espectrofotometria de Absorção Molecular.

Essa análise colorimétrica é sensível, simples e relativamente econômica. É usada extensivamente em monitoramento de rotina e não apresenta sérios interferentes em comparação a outras técnicas que também podem determinar baixos níveis de surfactantes (CROSS, 1970).

O procedimento analítico adotado neste trabalho para as análises de LAS em água seguiram as metodologias descritas em ABNT (1999); Apha (1998) e Koga *et al* (1999). Essa metodologia foi implantada e validada no Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR) da UFPE. O detalhamento de cada etapa dos procedimentos analíticos estão descritos nos itens abaixo.

Figura 18 - Reação azul de metileno e surfactante aniônico.



Fonte: Morita; Santana (2005).

4.2.1 Preparo das soluções

4.2.1.1 Solução estoque

O dodecilbenzeno sulfonato de sódio (C_{12} -LAS, pureza > 80%) foi utilizado como padrão para as análises do surfactante. Uma massa de 0,01 g deste padrão foi pesada e dissolvida em água ultrapura utilizando um balão volumétrico de 100 mL, afim de se obter

uma concentração final de 100 mg L^{-1} . A solução foi armazenada em geladeira e posteriormente utilizada para o preparo das soluções da curva analítica.

4.2.1.2 Solução do azul de metileno

Uma massa de 0,1g do reagente azul de metileno foi diluída em água destilada e a solução foi avolumada em um balão volumétrico para 100 mL. Posteriormente, 30 mL dessa solução foi pipetado para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionado 500 mL de água destilada, 6,8 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e 50g de di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O volume foi completado para 1000 mL com água destilada, obtendo-se uma concentração final de 100 mg L^{-1} .

4.2.1.3 Solução de lavagem

Foram dissolvidos 50 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em um béquer utilizando uma quantidade mínima de água destilada. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e foram adicionados 6,8 mL de H_2SO_4 . Após a dissolução, o volume do balão foi completado com água destilada, obtendo-se uma concentração final 50.000 mg L^{-1} .

4.2.2 Validação do método

4.2.2.1 Preparação da curva e linearidade do método

A partir da solução estoque de C_{12} -LAS (item 4.2.1.1), foram preparadas soluções de concentrações variando de 0,15 a $4,5 \text{ mg L}^{-1}$. Os volumes necessários para preparar cada solução estão descritos na Tabela 5. Essas soluções foram preparadas em amostras de água marinha sem os analitos de interesse, cuja salinidade foi ajustada com água destilada para valores próximos aos encontrados em ambientes estuarinos (~ 20).

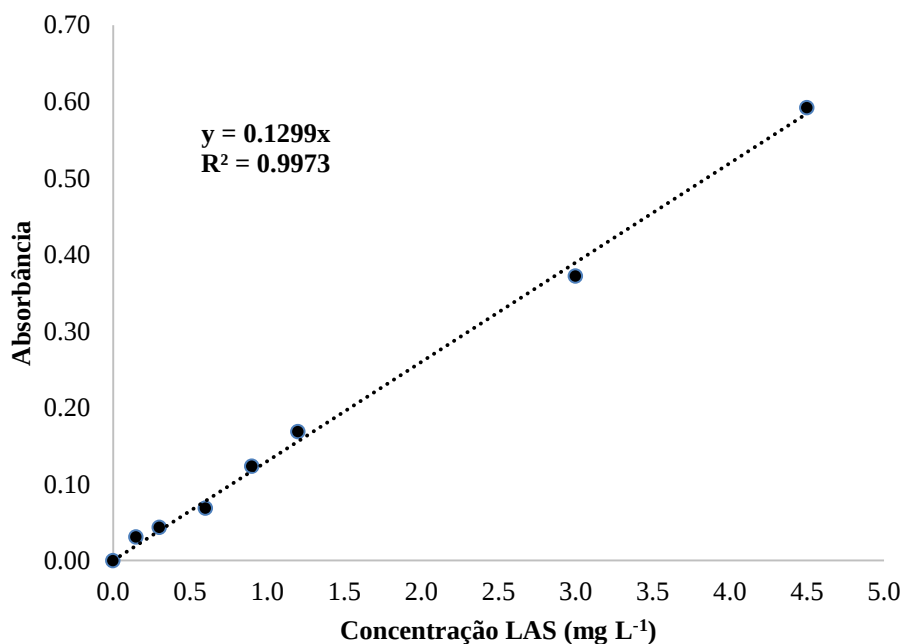
Tabela 5 - Volumes da solução estoque retirados para as soluções padrões.

Pontos da curva	Volume pipetado (μL)	Concentração LAS (mg L^{-1})
Controle	0	0
1	37,5	0,15
2	75	0,30
3	150	0,60
4	225	0,90
5	300	1,2
6	750	3,0
7	1125	4,5

Fonte: A Autora (2023).

Uma alíquota de 300 mL de água marinha foi transferida para um funil de separação de 500 mL, e foram adicionados os volumes da solução estoque de C_{12} -LAS (100 mg L^{-1}), referentes a cada concentração. Na sequência, foi adicionado 25 mL da solução de azul de metileno para cada amostra da curva. Em seguida foram realizadas três extrações sucessivas com alíquotas de 8 mL de clorofórmio cada. Na primeira extração foi adicionado cerca de 1 mL de álcool isopropílico para evitar a formação de emulsão. Após todas as extrações, a fase orgânica foi colocada em um funil de separação de 125 mL, onde foi adicionado 50 mL da solução de lavagem para retirada de possíveis interferentes. Após uma nova agitação o sobrenadante foi descartado e a fase orgânica foi transferida para um balão de 25 mL, sendo a solução avolumada para o respectivo volume com clorofórmio. Para a preparação do branco, o procedimento foi semelhante, apenas não foi adicionado na água o padrão de LAS. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorvância utilizando espectroscopia UV-VIS em 655 nm. Posteriormente, foi construída a curva analítica da concentração de LAS *versus* absorvância, obteve-se a equação e os parâmetros da reta a partir de regressão linear (Figura 19). O coeficiente de determinação (R^2) obtido para esta reta foi igual a 0,997 indicando que há uma relação linear entre a concentração de LAS e a absorvância, permitindo a confiabilidade dos dados.

Figura 19 - Curva analítica obtida no dia 22/09/ 2022 para LAS, dentro da faixa de 0,15 a 4,5 mg L⁻¹.



Fonte: A Autora (2023).

4.2.2.2 Precisão e exatidão

O teste de precisão e exatidão consistiu na fortificação de amostras de água marinha (300 mL) com quantidades conhecidas do analito de interesse, em três níveis de concentração (0,3; 0,6 e 3,0 mg L⁻¹), sendo estas analisadas em triplicatas.

A repetitividade e a recuperação foram calculadas para cada concentração segundo as equações 1 e 2 presentes nos itens 4.1.2.3. e 4.1.2.4. Os valores de CV (%) encontrados para as amostras analisadas dentro da faixa de trabalho para o LAS variou de 1,1 a 5,7%, indicando uma boa precisão do método (RIBANI *et al.*, 2004). Enquanto que o intervalo de recuperação variou de 98 a 119%, estando esses dentro dos limites aceitáveis (DENOUX; WANG, 1998).

4.2.2.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção do método (LD) foi determinado como sendo três vezes o desvio padrão das concentrações dos brancos de laboratório (QUEVAUVILLER *et al.*, 1992), resultando em 0,04 mg L⁻¹.

4.2.3 Análises de LAS em amostras de água

Após a coleta, alíquotas de 300 mL de cada amostra são filtradas (filtro de fibra de vidro GF/C, 47 mm, Waterman) para a remoção de materiais em suspensão. Em seguida, as amostras passam pelas mesmas etapas de extração de LAS para preparação da curva, descritas no item 3.2.2.1.

A absorbância das amostras foi medida por espectroscopia ultravioleta (UV) e visível (VIS) (SpectraMax M3 Molecular Devices) a 655 nm (APHA, 1998), sendo a concentração de LAS determinada através da curva analítica que varia de 0,15 a 4,5 mg L⁻¹.

4.3 CONTROLE DE QUALIDADE

Os controles de qualidade dos lotes amostrais de sedimento foram realizados através da análise de brancos processuais, amostras fortificadas e controle analítico. Para os lotes amostrais de água foi realizado apenas a análise de brancos processuais. Este procedimento é essencial para diminuir os erros de interpretação e assegurar a qualidade dos resultados.

4.3.1 Controle analítico

O controle analítico (CA) nos lotes de sedimento foi utilizado para calcular a recuperação dos padrões surrogados na amostra, bem como investigar a integridade das soluções de padrões utilizadas. Para cada lote analítico, foi preparado um CA, que foi constituído por 100 µl 1-C₁₂-LAB (padrão surrogado, 1000 ng L⁻¹), 100 µl 1-C₁₉-LAB (padrão interno, 1000 ng L⁻¹) e 100 µL da solução mista dos LABs (1000 ng L⁻¹) utilizada para fortificação das amostras. Após a adição de todas as soluções, o volume final foi ajustado para 1 mL e, posteriormente, injetado no cromatógrafo à gás sem passar por nenhum procedimento analítico. Os resultados são considerados como a recuperação de 100%. A recuperação dos padrões surrogados adicionados nas amostras antes dos procedimentos analíticos foi calculada em relação aos resultados obtidos no CA, segundo a equação 3:

$$REC (\%) = \frac{\left(\frac{PS}{PI}\right)_{AM}}{\left(\frac{PS}{PI}\right)_{CA}} * 100 \quad (3)$$

Onde: $\frac{PS}{PI} AM$ é a razão entre as áreas dos padrões adicionados às amostras

$\frac{PS}{PI} CA$ é a razão entre as áreas dos padrões do CA

4.3.2 Branco

Os brancos são utilizados para rastrear possíveis contaminações durante o processamento do lote analítico decorrente da vidraria, materiais e/ou solventes utilizados. Para as amostras de água, os brancos foram preparadas em triplicatas utilizando amostras de água salgada sem os analitos de interesse. Os brancos do sedimento foram preparados utilizando sulfato de sódio previamente muflado à 450 °C, por 6 horas, sendo adicionado o padrão surrogado (1-C₁₂-LAB, 1000 ng L⁻¹). Tanto os brancos das amostras de água quanto de sedimento foram submetidos aos mesmos procedimentos analíticos aplicados às amostras, conforme o item 3.2 e 3.4.

4.3.3 Amostras de sedimentos fortificadas

O objetivo das amostras de sedimentos fortificadas (AF) foi verificar a precisão e exatidão dos resultados obtidos. A exatidão foi verificada comparando os resultados obtidos com os esperados. Assim como os itens anteriores, foi preparada uma AF para cada lote analítico, sendo adicionado quantidades conhecidas dos analitos de interesse. A AF do sedimento foi feita utilizando material de referência (NIST SRM 1944) que apresenta concentrações muito baixas de LABs, sendo esta fortificada com 100 µl da solução mista dos LABs (1000 ng L⁻¹) e 100 µl 1-C₁₂-LAB (padrão surrogado, 1000 ng L⁻¹), com a finalidade de se obter a concentração de 100 ng L⁻¹ de cada composto de interesse. Na sequência as amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos descritos no item 4.2. O cálculo da recuperação dos analitos foi feito de acordo com a equação 4:

$$REC (\%) = \frac{C1}{C2} * 100 \quad (4)$$

Onde: C1 é a concentração do analito na amostra fortificada

C2 é a concentração real

4.4 PROPOSTA DA TESE

A ocorrência e o destino dos contaminantes químicos presentes nos esgotos têm sido reconhecidos como uma questão emergente na química ambiental e na saúde pública (CARREIRA *et al.*, 2001, RICHARDSON; TERNES, 2005). A presença difundida desses compostos no ambiente aquático está relacionada ao seu uso extensivo e/ou à sua incompleta remoção em estações de tratamento de esgoto (BUERGE *et al.*, 2003). Alguns destes contaminantes têm se mostrado muito úteis como ferramentas em estudos que visam investigar o grau de contaminação por esgotos de sistemas ambientais. Entretanto, dados e informações do comportamento de tais indicadores em estuários, rios e lagos ainda são raros e limitados a poucos países. O Sistema estuarino do Rio Capibaribe, em particular, encontra-se em uma zona extremamente impactada pela ação antrópica. A entrada de compostos orgânicos nesse estuário é consideravelmente elevada devido à falta de saneamento em residências localizadas próximas deste ambiente, onde os dejetos são lançados sem nenhum tratamento nos rios que o formam (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2016). Apesar da sua importância ecológica e socioeconômica poucos estudos foram realizados para avaliar a contaminação da área pelos compostos indicadores de esgoto doméstico (FERNANDES *et al.* 1999; CONDE, 2021). Diante disso, a realização de trabalhos como o presente estudo, que investigue de forma específica a contribuição dos esgotos para contaminação ambiental da área e os possíveis efeitos dos mesmos sobre a biota local, torna-se imprescindível. Além disso, estudos utilizando biomarcadores da contaminação por esgotos domésticos (LAB e LAS), no Norte e Nordeste do Brasil, ainda são muito escassos, o que torna este trabalho pioneiro numa importante região do Brasil.

Os resultados deste estudo estão apresentados na forma de três artigos científicos, sendo que o primeiro artigo foi publicado na revista “Environmental Pollution” e os outros dois estão sendo preparados para serem submetidos. No final é apresentada as considerações finais deste estudo.

Manuscrito 1: Sewage contamination assessment in an urbanized tropical estuary in Northeast Brazil using elemental, isotopic and molecular proxies

Neste manuscrito é descrito o grau de contaminação por esgoto doméstico e a contribuição relativa das fontes de carbono orgânico nos sedimentos da área de estudo,

através da avaliação das razões $(C/N)_a$, $\delta^{13}C$ do carbono orgânico e as concentrações dos alquilbenzenos linear (LABs). Aspectos de degradação de LAB também foram discutidos por meio de suas proporções de isômeros internos/externos. Este artigo está publicado no periódico **Environmental Pollution** e formatado de acordo com as normas do mesmo (<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120726>).

Manuscrito 2: Sewage outflow and contamination by linear alkylbenzenes and their anionic surfactant in a brazilian tropical urban estuary, during wet and dry seasons

Neste manuscrito foi feito uma investigação da contaminação e da distribuição espacial de LAS e LAB em águas superficiais e sedimentos da SERC, respectivamente, durante os períodos seco e chuvoso. Foi avaliado as possíveis diferenças entre os períodos e matrizes estudados. Além disso, também foi descrito o grau de contaminação das águas do SERC em relação ao LAS. Este manuscrito provavelmente será submetido ao periódico **Marine Pollution**.

Manuscrito 3: Efeito letal e subletal do surfactante C_{12} -LAS (Dodecilbenzeno sulfonato linear) e do seu precursor C_{12} -LAB (Dodecilbenzeno linear) no desenvolvimento embriolarval do *Danio rerio* utilizando biomarcadores morfológicos e comportamentais

Neste manuscrito foi feito uma avaliação da toxicidade do LAS e LAB para fases embriolarvais do *Danio rerio* considerando biomarcadores morfológicos e comportamentais com base em concentrações consideradas ambientalmente relevantes para a área de estudo, avaliando o potencial risco ambiental desses contaminantes para biota local. Este manuscrito provavelmente será submetido ao periódico **Chemosphere**.

5 MANUSCRITO 1: SEWAGE CONTAMINATION ASSESSMENT IN AN URBANIZED TROPICAL ESTUARY IN NORTHEAST BRAZIL USING ELEMENTAL, ISOTOPIC AND MOLECULAR PROXIES

Abstract

The Capibaribe Estuarine System (CES) is a tropical estuary located within a densely populated metropolitan region in the Brazilian Northeast, providing multiple ecosystem services including artisanal fisheries, tourism, and navigation. A significant load of domestic and industrial effluents is causing visible environmental degradation that needs to be characterized. This study evaluated the degree of contamination by domestic sewage and the relative contribution of organic carbon (OC) sources in sediments, measuring carbon-to-nitrogen atomic (C/N)_a ratios, $\delta^{13}\text{C}$ of OC, and linear alkylbenzene concentrations (LAB). SIAR mixing model indicated that estuarine phytoplankton and sewage contribute 73% and 22% to sedimentary OC [(C/N)_a ratios from 8.5 to 13, and $\delta^{13}\text{C}$ from -25.21 to -21.63‰], respectively, suggesting that eutrophication of CES is triggered by sewage inflow. CES was moderately contaminated by LAB, and highest concentrations observed in the inner portion, from 287 to 1349 ng g⁻¹ dry weight, suggests the retention of sewage. The mixing isotopic model indicated a significant dilution process of sewage-derived OC by estuarine phytoplankton. Lowest LAB in the lower estuary (mean: 319 ng g⁻¹dw) probably resulted from marine dilution. Principal component analysis demonstrated that mud regulates sedimentary OC content, and that the sewage plume regulates sedimentary LAB. High degradation of LAB isomers probably reflects the net heterotrophic condition of this system, also suggesting these compounds are introduced into CES partially degraded. Our results pointed out that degraded OM is a result of chronic and long-term sewage input. Considering the implications of sewage pollution to environmental and public health, there is an urgent need of better policies to improve domestic effluent treatment capacity, reducing contamination of estuarine environments.

Keywords: Urban effluents; stable carbon isotope; mixing model; linear alkylbenzenes; sediment

Introduction

Human settlements around estuaries are a world historical pattern stimulated by the availability of freshwater and great touristic and economic potential (Zanardi-Lamardo *et al.*, 2000; NOAA, 2022). This results in a large inflow of treated and untreated domestic sewage into estuaries, a major problem in marine pollution at a global level (Tuholske *et al.*, 2021; Wear *et al.*, 2021). Sewage may cause public health and environmental problems such as proliferation of pathogens, eutrophication, depletion of oxygen, and release of contaminants such as linear alkylbenzenes (LAB) present in detergents (Andersson *et al.*, 2016; Alkhadher *et al.*, 2020).

Sewage is an important anthropogenic source of organic matter (OM) to urban estuaries (Cotovicz *et al.*, 2019), whereas aquatic/terrestrial primary producers represent natural sources (Canuel; Hardison, 2016; Costa *et al.*, 2021a). The predominant origin of OM in eutrophic estuaries has been evaluated by carbon-to-nitrogen atomic ratio $[(C/N)_a]$ and stable carbon isotope ratio ($\delta^{13}C$) (Gao *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014a). Both $(C/N)_a$ ratio and $\delta^{13}C$ are widely used to evaluate the conservative mixing of OM from terrestrial plants and marine phytoplankton in estuaries (Kopprio *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Terrestrial plants synthesize nitrogen-poor OM $[(C/N)_a \text{ ratio} \geq 20]$ (Meyers, 1997) with ^{13}C -depleted signatures ($\delta^{13}C$ from -30 to -24‰ for C_3 plants and from -14 to -11‰ for C_4 plants) (Bouillon *et al.*, 2011; Cernusak *et al.*, 2013). Marine phytoplankton synthesizes nitrogen-rich OM $[(C/N)_a \text{ ratio} = 6.6, \text{ defined as the Redfield ratio; Schneider } et al., 2003]$ with relatively ^{13}C -enriched signatures ($\delta^{13}C$ from -23 to -19‰) (Bouillon *et al.*, 2011). In heterotrophic estuaries such as those polluted by domestic sewage, estuarine phytoplankton exhibits relatively ^{13}C -depleted signatures ($\delta^{13}C$ from -35 to -21‰) (Bouillon *et al.*, 2011). In contrast to natural OM sources, sewage is a lipid rich effluent with $(C/N)_a$ values around 10, higher than the Redfield ratio for phytoplankton, and relatively ^{13}C -enriched signatures ($\delta^{13}C$ from -28 to -16‰) (DeBruyn and Rasmussen, 2002; Rogers, 2003; Sophonsiri; Morgenroth, 2004; Huang *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021a). Therefore, sewage could be a major ^{13}C -enriched source to urban, heterotrophic estuaries with low organic carbon (OC) input from marine phytoplankton (Costa *et al.*, 2021a).

The LAB group consists of 26 secondary phenylalkanes with chain lengths ranging from 10 to 14 carbon atoms and have been used as specific proxies of sewage contamination in sediments (Martins *et al.*, 2014; Masood *et al.*, 2016; Alkhadher *et al.*, 2016; 2020). These compounds are used as precursors of linear alkylbenzene sulfonates (LAS), which are the

major anionic surfactants in the formulation of household detergents worldwide (Penteado *et al.*, 2006). A small proportion (1-3%) of the LAB is not converted to LAS, remaining in its original form in the detergent composition, and are released into estuaries during sewage discharges (Bakhtiari *et al.*, 2018). Due to its high molecular weight (218 to 274 g mol⁻¹) and high octanol-water partition coefficient ($\log K_{OW}$: 7–10) these compounds bind to particles, settle in sediment, and might undergo aerobic microbial degradation in a few days (3-9 days) or persist for approximately 20 years under anaerobic conditions (Takada; Ishiwatari, 1990; Hartmann *et al.*, 2000). The LAB can be classified according to the location of the phenyl group on the alkyl chain as internal isomers (phenyl group at positions 5 and 6) and external isomers (phenyl group at positions 2, 3 and 4) (Hartmann *et al.*, 2000).

Linear alkylbenzenes are frequently detected in sewage effluents and have been used as sewage indicators (Isobe *et al.*, 2004). Even though they do not pose major risks to biota (Binetti *et al.*, 2000; OECD, 2002) their presence may indicate the intrinsic potential toxicity of sewage that can jeopardize the ecosystem health. Chemical reactions occurring in natural environments are complex and increase in the presence of OM (Artifon *et al.*, 2019), suggesting that the distribution, transport, and fate of LAB are influenced by the type of OM in environmental samples such as observed for other hydrophobic pollutants (Kowalewska; Konat, 1997; Zhang *et al.*, 2019).

Capibaribe Estuarine System (CES) is a tropical estuary located within densely populated Recife City (1.6 million people; IBGE, 2021) on the northeastern Brazilian coast (Figure 1). Only 44% of the 432,000 houses are connected to sanitation systems (SNIS, 2019), and generate an outflow of 121,000 m³d⁻¹ (1.40 m³ s⁻¹) of treated domestic sewage, and 56% contribute to untreated discharges (IBGE, 2017; COMPESA, 2021). Consequently, eutrophic to hypereutrophic conditions prevail in the water column of this system (chlorophyll-a ranging from 1.86 to 164 mg m⁻³) (Santiago *et al.*, 2010; Flores-Montes *et al.*, 2011). Previous studies reported that CES is contaminated by sterols, metals and hydrocarbons (Fernandes *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2014b; Maciel *et al.*, 2015a;b; Maciel *et al.*, 2016). These studies suggested that domestic effluents may be a significant source of these contaminants, but they did not quantify the relative contribution of sewage to CES. A recent study using $\delta^{13}C$ values and aliphatic hydrocarbon concentrations suggested that sewage is the major source of oil-derived hydrocarbons to CES (Costa *et al.*, 2021b). The objective of this study was to investigate the contamination by domestic sewage in CES sediments and the type of sedimentary OM using (C/N)_a ratios, $\delta^{13}C$, and concentration of

LAB. Degradation aspects of LAB were also addressed through their internal/external isomers ratios.

Materials and methods

Study area and sediment sampling

The Capibaribe estuarine system (CES) is formed by the Capibaribe River, which annual discharge ranges from 2 to 30 m³ s⁻¹ (Schettini *et al.*, 2016), and Tejipló, Jordão, Pina, and Beberibe rivers (Figure 1). Tejipló and Beberibe rivers receive treated sewage from Mangueira (average outflow of 0.03 m³ s⁻¹) and Peixinhos (average outflow of 0.39 m³ s⁻¹) sewage treatment plants (STPs), respectively (COMPESA, 2021). The river's confluence area (represented by Sts. #1 and #2, Figure 1) receives sewage from Cabanga STP (average outflow of 0.92 m³ s⁻¹) (COMPESA, 2021). The long water residence time (7-25 days) (Gaspar *et al.*, 2018) results in a predominantly anoxic conditions at the sediment-water interface (Costa *et al.*, 2021a). The middle estuary of Capibaribe receives untreated sewage from low-income, densely populated areas (16,000 inhabitants km⁻²; PCR, 2005), in addition to the polluted Beberibe River waters. This system presents an interesting feature, the estuarine turbidity maximum (ETM, Figure 1). The concentration of suspended particulate matter (SPM) along the Capibaribe River estuary increases from 10 mg L⁻¹ near the mouth to 30 mg L⁻¹ in the ETM (Schettini *et al.*, 2016).

Surface sediments (2–4 cm) were collected at 7 stations in October 2020 (Figure 1) using a stainless steel van Veen grab sampler. St. #1 is located at the river's confluence; Sts. #2, #3, and #6 are close to sewage sources with a visible sewage plume; Sts. #4 and #5 are in the lower estuary under a higher marine influence; and St. #7 is inside the ETM. Sediments were kept in calcinated aluminium containers and frozen at -22 °C until laboratory processing.

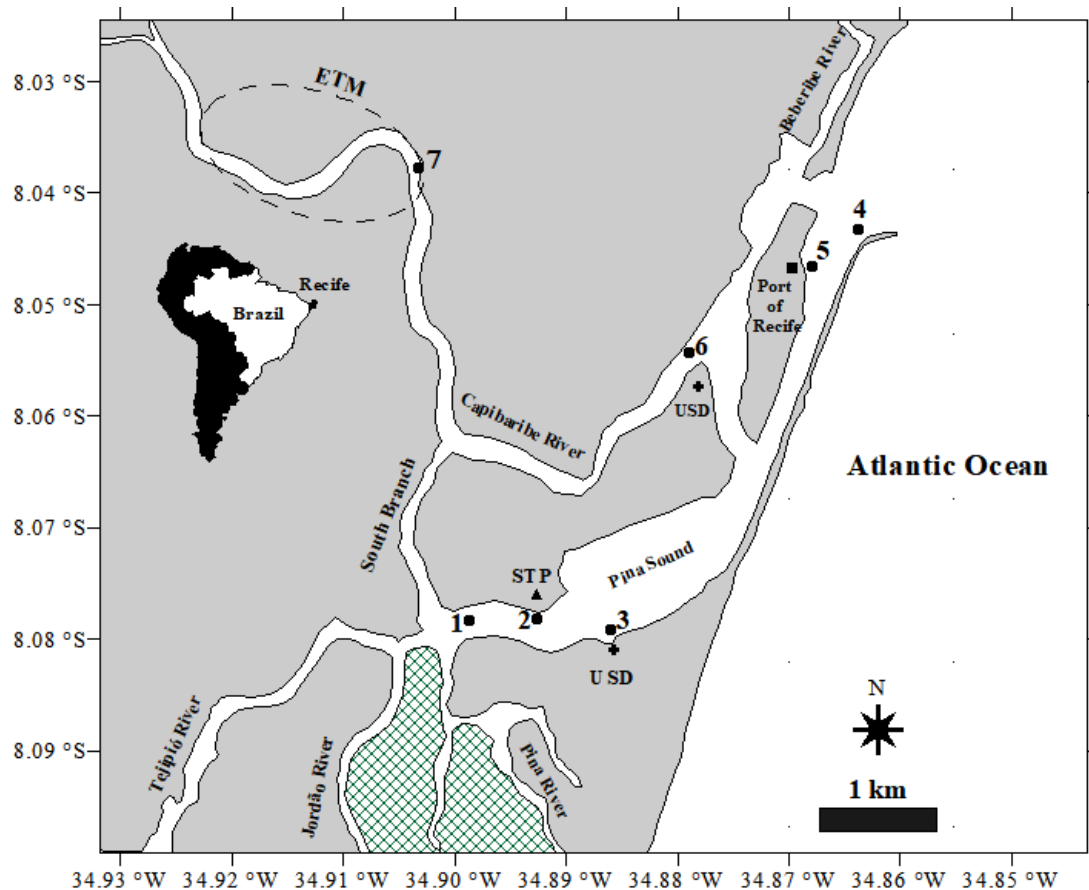


Figure 1. Map of Capibaribe Estuarine System (NE - Brazil) and sediment sampling sites (1-7) collected in October 2020. Shaded area: Mangrove Park. STP: Cabanga Sewage Treatment Plant; USD: Untreated Sewage Disposal; Dashed circle: area corresponding to the estuarine turbidity maximum (ETM).

Grain size analysis

Grain size analysis was carried out according to Barbosa and Suguio (1999) with modifications. Briefly, dry sediments (~ 30 g) were digested with 10% H_2O_2 to remove OM. The fraction $>63 \mu\text{m}$ was dry sieved to separate sand and gravel fractions, while the fine fractions ($< 63 \mu\text{m}$) were analysed by a pipetting method. Sediments were classified according to their mud content (silt + clay) (Flemming, 2000).

Elemental and isotopic analysis

Sediments were decarbonated with HCl (1 M) for 24 h prior to quantification of organic carbon (OC), total nitrogen (TN) and $\delta^{13}\text{C}$ values (Costa *et al.*, 2021a). Decarbonated sediments (~ 30 mg) were weighed in tin capsules and analysed in an EuroVector elemental analyser (model EA3000 Single) coupled to a Thermo isotope ratio mass spectrometer (model Delta V Advantage). Quantification of TN and OC in samples was conducted based on an analytical curve ($R^2 \geq 0.995$) using sediment B2151 as a reference material (*Elemental Microanalysis*, N = 0.52%, C = 7.45%, and $\delta^{13}\text{C} = -28.85\text{‰}$). $\delta^{13}\text{C}$ values were calculated using the Vienna Pee Dee Belemnite as reference standard (Coplen, 2011). (C/N)_a ratio was calculated according to Hedges and Stern (1984).

Isotopic mixing model

The SIAR mixing model (version 4.0) (Parnell *et al.*, 2008) was used to estimate the relative contributions of the major OC sources to CES according to Costa *et al.* (2021a). These authors identified estuarine phytoplankton [mean (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ of 6.46 ± 0.42 and $-23.61 \pm 2.90\text{‰}$, respectively], domestic sewage [mean (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ of 9.19 ± 1.13 and $-20.73 \pm 1.32\text{‰}$, respectively], and terrestrial plants [mean (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ of 20.8 ± 4.44 and $-29.25 \pm 2.23\text{‰}$, respectively] as the major OC sources to CES. The mixing model was run using the (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ values of these major sources and those values observed for sediments. Discrimination factor was set to 0 for both (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ values (Costa *et al.*, 2021a). Mean relative contribution from each OC source was calculated from the results ($n = 30,000$) of the model iterations.

Chemical analysis of LAB

The extraction and quantification of LAB in sediments followed procedures described in UNEP (1992) and Martins *et al.* (2014). Briefly, an aliquot of approximately 15 g of sediment was weighed and samples were spiked with 100 μL of the surrogate standard 1-C₁₂-LAB (1000 ng mL⁻¹). The samples were Soxhlet-extracted with 80 mL of a mixture of dichloromethane: n-hexane (1:1, v/v) for about 8 h. The extracts were eluted with 10 mL of n-hexane through an adsorption chromatography column (silica gel and alumina, both 5%

deactivated), concentrated to 1 mL, and added 100 μ L of internal standard (1-C₁₉-LAB, 1000 ng mL⁻¹). All standards were purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (purity >98%) (St. Louis, MO, USA).

The LAB quantification was performed using a gas chromatograph (GC - Agilent Technologies, model 7820) coupled to a mass spectrometer (MS - Agilent Technologies, model 5975C). The instrumental procedure was adapted from Martins *et al.* (2010), and Dauner and Martins (2015), and are described in detail in the supplementary material (SM1).

Quality Assurance / Quality Control

During isotopic analysis, the reference cylinder showed $\delta^{13}\text{C}$ mean equal to -29.10‰. Analytical precision (one standard deviation of duplicate samples) was 0.04% for elemental contents and 0.07‰ for $\delta^{13}\text{C}$ values. No peaks were detected in capsule blanks. LAB congeners were quantified using an internal calibration method based on nine-point calibration curves and regression coefficients (R^2) were greater than 0.996. Recovery of the surrogate standard (1-C₁₂-LAB) varied between 46% and 120% and was calculated considering the ratio between the areas of the internal standard (1-C₁₉-LAB) and surrogate standard. Duplicate samples were fortified with a solution containing all analytes and the recovery of individual compounds ranged from 70% - 87%. Coefficient of variation for these analytes ranged from 3.2 to 10.7 %. The limit of quantification (LQ) was calculated as the ratio of the lowest calibration concentration to the mass of sediment extracted, resulting in 0.17 ng g⁻¹ dry weight (dw) for all analytes. Analytes detected in laboratory blanks were subtracted from samples, and most of them were <LQ. Quality control parameters are within acceptable limits proposed to international marine pollution monitoring programs (e.g., Lauenstein and Cantillo, 1998) and reported in some environmental studies (Martins *et al.*, 2010; Alkhadher *et al.*, 2020; Bastos *et al.*, 2022).

Diagnostic ratios

Degradation of LAB was evaluated by the ratio between the concentrations of internal and external isomers (I/E ratio) based on equation 1:

$$I/E_n = \frac{6-C_n + 5-C_n}{4-C_n + 3-C_n + 2-C_n} \quad (1)$$

where n is the number of alkyl carbons and numbers 2, 3, 4, 5, and 6 refers to the position in which the phenyl group binds to the n -alkane (Takada; Ishiwatari, 1990).

The degree of LAB degradation (D) was calculated using the logarithmic equation proposed by Takada and Eganhouse (1998):

$$D (\%) = 81 * \log (I/E_n) + 15 \quad (2)$$

Statistical analysis

Linear regression analysis was used to model the relationship between the TN and OC contents. Normality of residuals was verified using the Lilliefors test. The significance level was set to 0.05 in both analyses (Bioestat 5.0 software). Principal component analysis (PCA) summarized the potential relationships between the following variables: mud and OC content, $(C/N)_a$ ratio, $\delta^{13}C$ value, total LAB concentration and (I/E) ratio. Components with eigenvalues >1 were extracted and absolute eigenvectors higher than 0.3 were used to interpret the results (Kaiser, 1970). Non-metric multidimensional scaling (MDS) plot was constructed using the Euclidean distance similarity matrix for visualizing the grouping of samples according to their localization (Clarke; Warwick, 2001). Multivariate analyses were carried out using normalized data on the Primer program (version 6) (Clarke; Gorley, 2006).

Results

Grain size distribution and total organic matter

Mud content (silt + clay) in sediment samples ranged from 7.6 to 99 % (Table 1). Mud in sediments from the lower estuary (Sts. #4 and #5) were highest ($> 96\%$; Table 1) and they were classified as mud (Flemming, 2000). In contrast, the other sediments – all from inner estuary – were classified as slightly muddy sand (5-25% mud) (Table 1), except St. #3, classified as muddy sand (25-50% mud) (Table 1).

Table 1. Sediment characteristics based on granulometric distribution, organic carbon (OC), total nitrogen (TN) and linear alkylbenzene concentrations (LAB), LAB internal-to-external ratios (I/E_n) and degradation rates (D_n) of LAB in samples from Capibaribe Estuarine System.

	Sampling stations						
	1	2	3	4	5	6	7
Sand + Gravel (%)	92	83	59	4.0	0.8	78	87
Mud (%)	7.6	17	41	96	99	22	13
OC (%)	0.55	1.1	1.9	1.6	1.9	2.2	1.1
TN (%)	0.06	0.15	0.20	0.19	0.20	0.27	0.10
Relative source contributions (%)							
Estuarine phytoplankton	87	55	87	41	60	88	92
Domestic sewage	10	39	4	51	34	10	6
Plants	3	6	9	8	6	2	2
[LAB, ng g⁻¹dw]							
Σ -C ₁₀	10	31	26	14	8.4	47	59
Σ -C ₁₁	75	177	155	83	62	291	306
Σ -C ₁₂	89	275	301	113	120	472	429
Σ -C ₁₃	100	295	430	107	129	519	480
Σ -C ₁₄	13	5.3	2.8	ND	0.6	20	1.8
Σ LAB ^a	287	783	915	317	320	1349	1276
I/E_{11} ratio	2.3	1.9	2.8	1.8	2.9	2.2	1.6
D_{11} (%)	44	38	51	35	52	43	31
I/E_{12} ratio	2.3	2.5	3.2	2.4	2.2	2.7	2.2
D_{12} (%)	44	47	56	46	43	50	43
I/E_{13} ratio	2.5	2.9	4.2	2.8	3.8	3.2	3.2
D_{13} (%)	47	52	65	52	62	56	56

^a Σ LAB: sum of the 26 LAB congeners ranging from C₁₀ to C₁₄

ND: not detected

Sediment OC and TN ranged from 0.55 to 2.2% (mean: 1.5%) and from 0.06 to 0.27% (mean: 0.16%), respectively (Table 1). TN was significantly related to OC content with an intercept equal to zero ($F_{1,5} = 137$; $p < 0.0001$; $r^2 = 0.93$). A mixing polygon from major local OC sources was proposed by Costa et al. (2021a). This polygon was constructed using the sources (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ signatures as vertices (Figure 2). All studied samples fell within the bounds of this polygon with (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from 8.5 to 13 (mean: 10) and from -21.63 to -25.21‰ (mean: -23.41‰), respectively (Figure 2). Sediment OC exhibited a progressive ^{13}C -depletion from lower to middle estuary. Applying the SIAR mixing model resulted in mean relative contributions from phytoplankton of 73% (ranging from 41 to 92%), domestic sewage of 22% (ranging from 4 to 51%) and terrestrial plants of 5% (ranging from 2 to 9%) (Table 1).

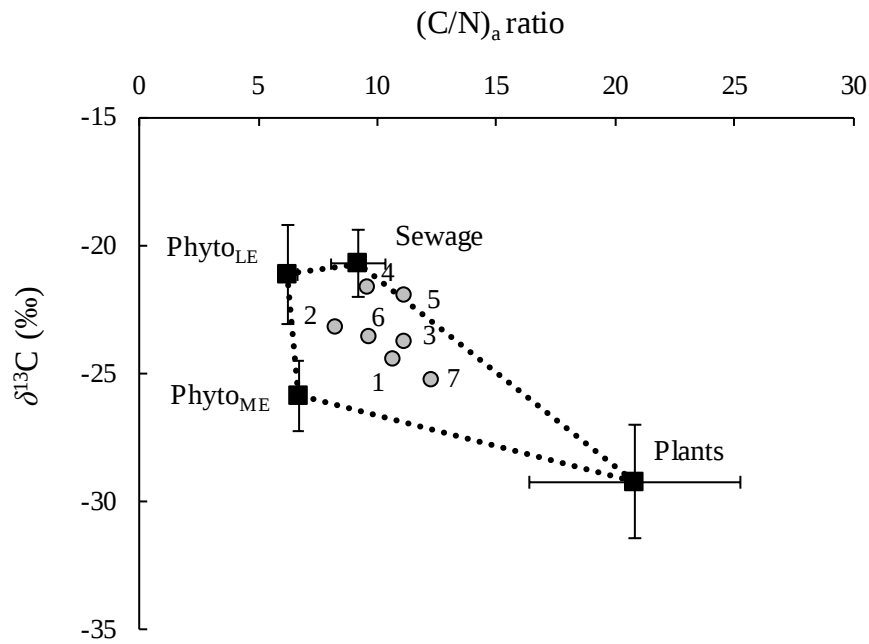


Figure 2. Cross-plot of $(C/N)_a$ ratio versus $\delta^{13}C$ of sedimentary organic matter from outer (Sts. #4 and #5), middle (Sts. #1, #2, #3, and #6) and inner sections (St. #7) of Capibaribe Estuarine System. The filled squares represent the mean signatures $\pm$ standard deviation of the major organic carbon sources to CES (Costa et al., 2021a). Phyto = phytoplankton from lower estuary (LE) and from middle estuary (ME).

Distribution, composition, and diagnostic ratios of LAB

Total LAB concentrations (ΣLAB) ranged from 287 to 1349 ng g⁻¹ dw (mean: 750 ng g⁻¹ dw) (Table 1). Highest concentrations were observed in the lower limit of the Capibaribe River middle estuary (St. #6) and in the station inside the ETM (St. #7) (Table 1). In contrast, lowest concentrations of LAB were recorded at the river's confluence (St. #1) and in the lower estuary (Sts. #4 and #5). Total LAB were predominantly composed by C₁₃ and C₁₂ homologs (mean of 39 $\pm$ 4% and 34 $\pm$ 2%, respectively), followed by C₁₁ (mean 22 $\pm$ 3%), C₁₀ (mean 4 $\pm$ 1%), and C₁₄ (mean 1 $\pm$ 2%) (Figure SM1). I/E₁₁, I/E₁₂ and I/E₁₃ ratios ranged from 1.6 to 2.9, from 2.2 to 3.2 and from 2.5 to 4.2, respectively (Table 1). Degradation rate of LAB ranged from 31 to 52% for C₁₁, from 43 to 56% for C₁₂ and from 47 to 65% for C₁₃ (Table 1). The overall mean rate was 48 $\pm$ 8%, suggesting an elevated LAB degradation.

Multivariate analysis

Two components extracted by PCA explained 69% of the total variance (Figure 3a). PC1 explained 41% of the total variance and presented high loads of mud, OC and $\delta^{13}\text{C}$ (Figure 3a). PC2 explained 28% of the total variance and exhibited high loadings for ΣLAB concentrations and I/E₍₁₁₋₁₃₎ ratios (Figure 3a). MDS separated the stations according to similarities among them. Four groups could be observed and were highlighted by dashed lines with stations indicated by different symbols: (G1) formed by samples from lower estuary (Sts. #4, #5), (G2) samples close to sewage disposal (Sts. #2, #3, #6), (G3) river's confluence (St. #1), and (G4) from ETM (St. #7) (Figure 3b).

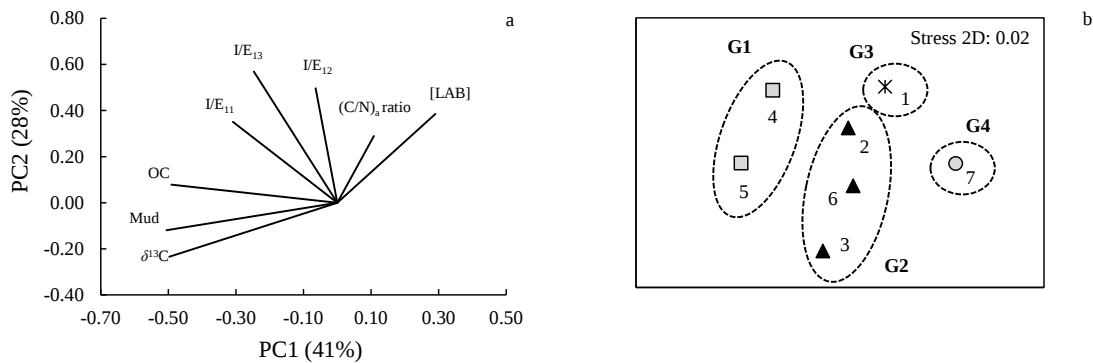


Figure 3. Loadings of variables in components from the principal component analysis (a) and non-metric multidimensional scaling (MDS) plot (b) constructed using the mud and organic carbon (OC) contents, (C/N)_aratio, $\delta^{13}\text{C}$ values, total linear alkylbenzenes (LAB) concentrations and I/E₍₁₁₋₁₃₎ ratio. MDS grouped samples according to similarities among them: lower estuary (G1, including Sts. #4 and 5), under direct sewage plume influence sources (G2, including Sts. #2, #3, and #6), river's confluence (G3, only St. #1) and estuarine turbidity maximum (G4, only St. #7).

Discussion

Evaluation of the sources of organic matter in sediments using (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ values

Estuarine phytoplankton and sewage are the major OC sources to sediments at CES (Table 1 and Figure 2) as previously reported by Costa *et al.* (2021a). The (C/N)_a ratios observed suggest that sewage-derived OM have been preserved under the predominant anoxic conditions at the sediment-water interface, typical of CES. An interesting feature was observed at Sts. # 4 and #5 in the lower estuary, with an increase of (C/N)_a ratio relative to the phytoplankton signature, probably reflecting the diagenetic shift of nitrogen-rich,

phytoplankton-derived OM (Lehmann *et al.*, 2002). Some previous studies reported that (C/N)_a ratios lower than 14 suggests low contribution from superior plants (Fernandes *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2021b). The values obtained in this study were like those observed in coastal marine systems contaminated by sewage derived OC (Table SM1).

Sedimentary (C/N)_a ratio was not related to $\delta^{13}\text{C}$ values (Figure 3a), suggesting a non-conservative OM mix between estuarine phytoplankton and domestic sewage (Thornton; McManus, 1994; Zimmerman; Canuel, 2001). Probably the deviation from conservative mixing model comes from the shift of $\delta^{13}\text{C}$ signatures of phytoplankton along the longitudinal axis of CES (Figure 2). In the lower estuary, ^{13}C -enriched sedimentary OM ($\delta^{13}\text{C} = -21.81 \pm 0.25\text{‰}$) suggests that phytoplankton assimilates mainly dissolved inorganic carbon (DIC) from marine sources ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ from -2 to +2‰, Mook; Tan, 1991). In contrast, ^{13}C -depleted sedimentary OM ($\delta^{13}\text{C} = -24.05 \pm 0.80\text{‰}$) in the inner estuary indicates an assimilation of DIC from a ^{13}C -depleted pool. The progressive ^{13}C -depletion of sediment OM from lower to middle estuary probably reflects the impact of the high load of untreated sewage on the ecosystem metabolism of CES, i.e., the balance between autotrophic production and heterotrophic respiration. The CES is a net heterotrophic ecosystem (whole ecosystem metabolism of $-140 \pm 101 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$) and that increases two orders of magnitude from lower to upper estuary (from -1.3 ± 0.6 to $-388 \pm 230 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$) (Noriega *et al.*, 2013). The heterotrophic respiration results in a high ^{13}C -depletion of the DIC compared to $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ marine values (Chanton; Lewis, 1999; Cotovicz *et al.*, 2019), since ^{12}C is degraded preferentially over ^{13}C by bacteria (Dong *et al.* 2017). At CES, ^{13}C -depletion of sediment OM in the inner estuary suggests that there is a net transport of phytoplankton and sewage-derived OC towards heterotrophic areas such as the ETM (Abril *et al.*, 2004), located at approximately 15 km from the estuary mouth (Schettini *et al.*, 2016). This hypothesis is corroborated by the predominance of sedimentary OM [mean (C/N)_a ratio and $\delta^{13}\text{C}$ of 11.7 ± 3.3 and $-25.27 \pm 1.02\text{‰}$; Oliveira *et al.*, 2014a; Régis *et al.*, 2018] with signatures similar to those observed in the present study [(C/N)_a ratio 10.5 ± 1.3 and $\delta^{13}\text{C}$ $-23.41 \pm 1.28\text{‰}$].

The first component of PCA (Figure 3a) indicated that sediment OC content is regulated by mud content. This is observed in estuaries with calm hydrodynamic conditions that favour the deposition of fine-grained suspended particles (Gireeshkumar *et al.*, 2013). The mud fraction from CES adsorbs on average 88% (ranging from 61 to 98%) of sedimentary OC (Costa, 2018). A positive association between $\delta^{13}\text{C}$ and mud content (Figure

3a) corroborates the data observed previously, where mud fraction preferentially adsorbed OC from ^{13}C -enriched sources such as domestic sewage (Costa *et al.*, 2021b).

Contamination of CES by LAB

The SIAR mixing model indicated a significant relative contribution of sewage-derived OC to sediments from inner estuary of CES (ranging from 4 to 39%) (Table 1). The highest relative contribution was observed in sediments adjacent to Cabanga STP (St. # 2) (Figure 1). This reflects the low reduction (30%) (ANA, 2017) of the biochemical oxygen demand (BOD) during primary sewage treatment at Cabanga STP. Cabanga is the major STP at CES basin receiving domestic sewage from approximately 336,000 inhabitants and releasing into the CES $0.46 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ of treated domestic sewage effluents (per capita sewage load of $1.3 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) (ANA, 2017; COMPESA, 2021). Consequently, a high load of sewage-derived OC and LAB are continuously released into CES.

Total LAB concentrations in sediments ranged from 287-1349 $\text{ng g}^{-1}\text{dw}$ with an average of $750 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ (Table 1). Quantification of LAB has been successfully applied in studies of sewage contamination in urbanized coastal environments. Concentrations of ΣLAB at CES were higher than those reported in several studies around the world, such as in São Sebastião Channel (Brazil), Todos Santos Bay (Mexico), Pearl River Estuary, Xijiang River, and Costal Shelf (all in China), and Pulau Merambong (Malaysia) (Table 2). Concentrations at CES are similar to those reported for sediments from Santos Bay and Lagoa dos Patos Estuary (both in Brazil), Tokyo Bay (Japan), and Chaohu Lake (China) (Table 2). Conversely, concentrations at CES were significantly lower than those observed in sediments from some coastal areas of Southeast Asia (Indonesia and Philippines), Jakarta Bay (Japan), Prai River (Malaysia), and Anzali Wetland (Iran) (Table 2). Considering LAB concentrations reported worldwide, we propose a LAB sediment contamination classification for coastal environments ranging from low ($< 200 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$), moderate ($200 - 2000 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$), high ($2000 - 6000 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$), and very high ($> 6000 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$). Based on these ranges CES is classified as moderately contaminated.

Table 2. Total LAB concentrations (ng g⁻¹ dry weight) in surface sediment samples collected from different locations

Local	Mean (ng g ⁻¹)	Range (ng g ⁻¹)	Diagnostic	Reference
Santos Bay, Brazil	116	17-431	Low-Moderate	Medeiros; Bicego, 2004a
São Sebastião Channel, Brazil	19	13-28	Low	Medeiros; Bicego, 2004b
Todos Santos Bay, Mexico	32	2-93	Low	Macias-Zamora; Ramirez-Alvarez, 2004
Philippines	2.1 *10 ³	56-1.3 *10 ⁴	Low-High	Isobe <i>et al.</i> , 2004
Indonesia	9.4 *10 ³	3-4.1 *10 ⁴	Low-Very High	Isobe <i>et al.</i> , 2004
Lagoa dos Patos Estuary, Brazil	531	3.2-1.6 *10 ³	Low-Moderate	Medeiros <i>et al.</i> , 2005
Pearl River Delta, China	-	6-26	Low	Luo <i>et al.</i> , 2008
Xijiang River, China	-	21-69	Low	Luo <i>et al.</i> , 2008
Chaohu Lake, China	252	18-5.7 *10 ³	Low- High	Wang <i>et al.</i> , 2012
Jakarta Bay, Japan	1.3 *10 ⁴	235-8.7 *10 ⁴	Very High	Rinawati <i>et al.</i> , 2012
Tokyo Bay, Japan	751	394-1.1 *10 ³	Moderate	Rinawati <i>et al.</i> , 2012
Costal Shelf, China	25	6-77	Low	Wei <i>et al.</i> , 2014
Prai River, Malaysia	2.4 *10 ³	(2.0-2.9) *10 ³	Moderate -High	Magam <i>et al.</i> , 2016
Anzali Wetland, Iran	5.9 *10 ³	394-1.1 *10 ⁵	High -Very High	Bakhtiari <i>et al.</i> , 2018
Pulau Merambong, Malaysia	83	67-98	Low	Alkhadher <i>et al.</i> , 2020
Capibaribe Estuarine System, Brazil	750	287-1.3 *10 ³	Moderate	Present study

The main surfactant commercialized in Brazil is DetenLAB®240, accounting for 95% of national production. It has the following relative percentage for each isomer group: C₁₀ (5-16%), C₁₁ (28-45%), C₁₂ (25-30%), C₁₃ (10-30%) and C₁₄ (<1.0%) (Martins *et al.*, 2010). This prevalence of C₁₃ and C₁₂-LAB homologs was observed in the present study as well as in

previous studies carried out along the Brazilian coast (Medeiros; Bícigo, 2004; Medeiros *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2010, 2014; Dauner; Martins, 2015). Additionally, the low concentrations of C₁₀ homologs in sediments may also reflect its higher solubility (Alkhadher *et al.*, 2015). On the other hand, C₁₄ homologs have higher degradation rate when compared to its homologs and is rarely observed in commercial detergent formulations, justifying its lower concentrations or absence in environmental samples (Raymundo; Preston, 1992; Medeiros *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2008).

Degradation of LAB

Sediment LAB showed a high degree of degradation (I/E_n ratio > 2) (Table 1). This ratio increases during LAB degradation once external isomers are preferentially degraded relative to internal isomers (Eganhouse *et al.*, 1983; Takada; Ishiwatari, 1990). In addition, I/E_n ratio can also be used to assess the degree of sewage treatment (Takada; Eganhouse, 1998). Generally, LAB in untreated and primary treated sewage have I/E_n ratio below or close to 1, while LAB in secondarily treated sewage exhibit I/E_n ratio varying from 2 to 7 (Takada; Eganhouse, 1998). At CES, the high I/E_n ratio and the estimated LAB degradation (Table 1) probably reflect the chronic input of sewage and the heterotrophic condition observed by Noriega *et al.* (2013; 2015). It is probable that sewage treatment is not the dominant process of LAB degradation since most of the local STPs exhibit BOD reduction $\leq 70\%$ (ANA, 2017). One hypothesis raised is that the heterotrophic condition at CES surface waters favor LAB degradation. The degradation of sewage-derived OC is favored by the high temperatures (26 - 30 °C) (Noriega *et al.*, 2015) of surface waters throughout the year. This would explain the positive association between LAB concentrations and I/E_n ratios observed in the second component of PCA (Table 2). Another possibility, not excluding the first one, is that LAB degradation is occurring before it is released into the estuary, and these records are preserved in the sediment under the prevalent anoxic conditions at the water-sediment interface (Somerfield *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2021a). This second hypothesis gains strength based on apparent linear relationship between the $(C/N)_a$ and I/E_{12} ratios in sediments under the influence of a sewage plume (Sts. #2, #3, and #6) (Figure SM2). An opposite pattern observed in this study was reported in some studies where I/E_n ratios lower < 1.5 were verified in areas close to effluent discharges both without and/or with primary treatment (Martins *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Masood *et al.*, 2015), and even in anoxic areas (Rinawati *et al.*, 2012; Masood *et al.*, 2015). It is important to highlight that chronic sewage contamination and

its effects on ecosystem metabolism of CES is indicated by high concentrations of Σ LAB and high I/E ratio.

Integrating sediment characteristics along CES

Sediment samples from CES were grouped into four distinct groups according to their OC content and origin as well as LAB contamination (Figure 3b). The first group (G1) contains samples from the lower estuary (Sts. #4 and #5) which is an area of deposition of fine-grained suspended particles and phytoplankton-derived detritus. The relatively low concentrations of Σ LAB ($317 - 320 \text{ ng g}^{-1}$) (Table 1) might reflect the dilution of the polluted riverine fluxes by cleaner marine waters. This was previously reported for the longitudinal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and tributyltin in CES (Maciel *et al.*, 2015b; 2018).

The second group (G2) contains samples collected at Sts. #2, #3, and #6 influenced by sewage plumes, where highest Σ LAB concentrations ($783 - 1349 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$) were detected in sandysediments (Table 1). Grain size is possibly not the main controlling factor for the accumulation of these organic compounds. Instead, the proximity of sewage release seems to be a predominant factor in LAB distribution, as also reported for Babitonga Bay (Martins *et al.*, 2014). St. #3 receives untreated sewage discharge, while St. #2 receives primarily treated sewage from Cabanga STP, indicating that the treatment did not significantly reduce the effluent Σ LAB concentrations. There is no information about the efficiency of LAB removal on the STPs, but there is an inefficient BOD reduction at Cabanga STP. Additionally, G2 group reflects the influence of a highly contaminated Beberibe River plume on the Capibaribe River middle estuary as indicated by the highest Σ LAB at St #6 (Figure 1). The Σ LAB concentrations observed in G2 group indicate that there is an urgent need for improving the sewage treatment in this area. It is important to emphasize that the high contribution of phytoplankton-derived OC to G2 samples (mean $\pm$ std dev: $76 \pm 15\%$) suggests that phytoplankton dilutes the OC input from sewage and/or influences the distribution/transport of sewage-derived pollutants. The understanding of the complexing capacity of different types of OM with pollutants is still a challenge to researchers and further studies are necessary (Artifon *et al.*, 2019).

The G3 group (St. #1) reflects the granulometric control on the OC and sediment LAB contents. Despite the proximity to Cabanga STP (Figure 1), this sediment exhibited low LAB concentration due to its very low mud content (8%). Additionally, even though Capibaribe

(South branch), Jordão, and Tejipió Rivers (Figure 1) receive a high sewage load, their low discharge ($\sim 0.003 \text{ m}^3/\text{s}$) (ANA, 2017) favor the deposition of sewage-derived particles along the riverbed, resulting in a low ΣLAB at St. #1.

The G4 group (St. #7) is located inside the ETM, characterized by the high concentration of suspended particulate matter (Schettini *et al.*, 2016a). The OC and sediment LAB concentrations is probably mainly due to the transport of phytoplankton and sewage derived OC from the low estuary towards the ETM. Previous studies have reported accumulation of contaminants associated with locally suspended material in water samples from tropical estuaries within the ETM (Régis *et al.*, 2018; Arruda-Santos *et al.*, 2018). During the low tide, particulate matter ends up at the bottom of the estuary due to flocculation process (Döbereiner, 1982). It is known that downstream of this area the river passes through densely, low-income populated areas with low rates of sewage collection (Zanardi-Lamardo *et al.*, 2016). Therefore, at this point, it is possible that most of the sewage load released downstream are transported by tidal forces, retained, and eventually settled, resulting in higher concentrations of contaminants.

Conclusions

The use of a multi proxy approach based on molecular, elemental, and isotopic markers is a powerful tool to investigate contaminant concentrations and their association to different kinds of organic material. A significant dilution process of sewage-derived OC by estuarine phytoplankton was verified. Contamination of CES by LAB was classified as moderate. Sewage plumes influence and proximity to the estuarine turbidity maximum zone were more associated with higher sediment ΣLAB than mud content. The LAB degradation indices reflected the heterotrophic condition of this environment and revealed that urban effluents are being introduced chronically with partially degraded LAB.

Acknowledgments

The authors thank DICAM II (CAPES, 23038.001423/2014-29) for funding analytical standards of the LAB used in this work. The MSc. Roxanny Santos thanks CAPES for granting her scholarship PhD level. National Council funds EZL for Scientific and Technological Development (CNPq grants n°. 311771/2019-0).

References

- Abril, G; Commariieu, MV; Maro, D; Fontugne, M; Guérin, F; Etcheber, H. 2004. A massive dissolved inorganic carbon release at spring tide in a highly turbid estuary. *Geophys. Res. Lett.* 31, 1-4.
- Alkhadher, SAA; Zakaria, MP; Yusoff, FM; Kannan, N; Suratman, S; Keshavarzifard, M; Magam, SM; Masood, N; Vaezzadeh, V; Sani, MSA. 2015. Baseline distribution and sources of linear alkyl benzenes (LABs) in surface sediments from Brunei Bay, Brunei. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 397–403.
- Alkhadher, SAA; Zakaria, MP; Yusoff, FM; Kannan, N; Suratman, S; Magam, SM. 2016. Distribution and sources of linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments from Johor Bahru Coast and the Kim Kim River, Malaysia. *Environ. Forensic* 17, 36–47.
- Alkhadher, SAA; Kadir AA; Zakaria, MP; Al-Gheethi, A; Keshavarzifard M; Massod, N; Alenezi, KM; Magam, SM. 2020. Linear alkylbenzenes in surface sediments of an estuarine and marine environment in peninsular Malaysia. *Mar. Pollut. Bull.* 153, 1–10.
- ANA (Agência Nacional das Águas). 2017. Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas.
- Andersson, K; Rosemarin, A; Lamizana, B; Kvarnström, E; McConville, J; Seidu, R; Dickin, S; Trimmer, C. 2016. Sanitation, waste water management and sustainability: from waste disposal to resource recovery. 2nd edition. Nairobi and Stockholm: United Nations Environment Programme and Stockholm Environment Institute, p. 150.
- Arruda-Santos, RH; Schettini, CAF; Yogui, GT; Maciel, DC; Zanardi-Lamardo, E. 2018. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. *Sci. Total Environ.* 624, 935–944.
- Artifon, V; Zanardi-Lamardo, E; Fillmann, G. 2019. Aquatic organic matter: classification and interaction with organic microcontaminants. *Sci. Total Environ.* 649, 1620-1635.
- Bakhtiari, AR; Javedankherad, I; Mohammadi, J; Taghizadeh, R. 2018. Distribution of linear alkylbenzenes as a domestic sewage molecular marker in surface sediments of International Anzali Wetland in the southwest of the Caspian Sea, Iran. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 20920-20929.
- Barbosa, CF; Suguio, K. 1999. Biosedimentary facies of a subtropical microtidal estuary; an example from southern Brazil. *J. Sediment. Res.* 69, 576-587.
- Bastos, RF; Lippi, DL; Gaspar, ALB; Yogui, GT; Frédou, T; Garcia, AM; Ferreira, BP. 2022. Ontogeny drives allochthonous trophic support of snappers: Seascape connectivity along the mangrove-seagrass-coral reef continuum of a tropical marine protected area. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 264, 107591.
- Binetti, R; Attias, L; Di Marzio, G; Calcinai, D; Cavalli, L. 2000. Environmental risk assessment of linear alkyl benzene, an intermediate for the detergency industry. *Int. J. Environ. Health Res.* 10, 153-172.
- Bouillon, S; Connolly, RM; Gillikin, DP. 2011. Use of stable isotopes to understand food webs and ecosystem functioning in estuaries. In: Wolanski, E., McLusky, D.S. (Eds.), *Treatise on Estuarine and Coastal Science, Functioning of Ecosystems at the Land-ocean Interface*, vol. 7. Academic Press, Amsterdam, 143 - 174.
- Canuel, EA; Hardison, AK. 2016. Sources, ages, and alteration of organic matter in estuaries. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 8, 409-434.

- Chanton, JP; Lewis, FG. 1999. Plankton and Dissolved Inorganic Carbon Isotopic Composition in a River-Dominated Estuary: Apalachicola Bay, Florida. *Estuaries* 22, 575-583.
- Clarke KR; Warwick RM. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory
- Clarke, KR; Gorley, RN. 2006. Primer: User Manual/Tutorial. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory.
- Cernusak, LA; Ubierna, N; Winter, K; Holtum, JÁ; Marshall, JD; Farquhar, GD. 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phyt.* 200, 950-965.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Saneamento). 2021. Available in: <https://servicos.compesa.com.br/>. Request for Access to Information number 202149257.
- Coplen, TB. 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2538–2560.
- Costa, BVM. 2018. Origem e degradação da matéria orgânica em um estuário tropical eutrofizado. *Trop. Oceanog.* 46, 25-47.
- Costa, BVM; Moreira, MZ; Bastos RF; Yogui, GT. 2021a. Distribution and origin of sedimentary organic matter in an eutrophic estuary: Pina Sound – NE Brazil. *An. Braz. Acad. Sci.* 93, 20190638.
- Costa, BVM; Santos, PJP; Yogui, GT. 2021b. Origin and Distribution of Total Organic Matter and Aliphatic Hydrocarbons in Sedimentary Fractions of a Highly Urbanized, Tropical Estuary. *Estuaries Coast.* 81, 1-12.
- Cotovicz Jr, LC; Knoppers, BA; Deirmendjian, L; Abril, G. 2019. Sources and sinks of dissolved inorganic carbon in an urban tropical coastal bay revealed by $\delta^{13}\text{C}$ -DIC signals. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 220, 185-195.
- Dauner, ALL; Martins, CC. 2015. Spatial and temporal distribution of aliphatic hydrocarbons and linear alkylbenzenes in the particulate phase from a subtropical estuary (Guaratuba Bay, SW Atlantic) under seasonal population fluctuation. *Sci. Total Environ.* 536, 750–760.
- DeBruyn, AM; Rasmussen, JB. 2002. Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecol. Applic.* 12, 511-520.
- Döbereiner, C. 1982. Aggregation and deposition of fine particles in the Tay estuary. Scotland, UK. Tese (Doutorado em Filosofia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Dundee, p. 151.
- Dong, X; Jochmann, MA; Elsner, M; Meyer, AH; Backer, LE; Rahmatullah, M; Schunk, D; Lens, G; Meckenstock, RU. 2017. Monitoring Microbial Mineralization Using Reverse Stable Isotope Labeling Analysis by Mid-Infrared Laser Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 51, 11876-11883.
- Eganhouse, RP; Blumfield, DL; Kaplan, IR. 1983. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 17, 523–530.
- Fernandes, MB; Sicre MA; Cardoso JN; Macêdo SJ. 1999. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 231, 1-16.
- Flemming, BW. 2000. A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis ternary diagrams. *Cont. Shelf Res.* 20, 1125-1137.

- Flores Montes, MDJ; Paulo, JG; Nascimento Filho, GA; Gaspar, FL; Feitosa, FA; Santos Junior, AC; Batista, T NF; Travassos, RK; Pitanga, ME. 2011. The trophic status of an urban estuarine complex in Northeast Brazil. *J. Coast. Res.* 64, 408–411.
- Gao, X; Yang, Y; Wang, C. 2012. Geochemistry of organic carbon and nitrogen in surface sediments of coastal Bohai Bay inferred from their ratios and stable isotopic signatures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1148 –1155.
- Gaspar FL; Pinheiro BR; Noriega CED; Araujo M; Lefèvre N; Montes MDJF. 2018. Alkalinity, inorganic carbon and CO₂ flux variability during extreme rainfall years (2010–2011) in two polluted tropical estuaries NE Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 66, 115–130.
- Gireeshkumar, TR; Deepulal, PM; Chandramohanakumar, N. 2013. Distribution and sources of sedimentary organic matter in a tropical estuary, south west coast of India (Cochin estuary): A baseline study. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 239-245.
- Hartmann, PC; Quinn, J; King, JW; Tsutsumi, S; Takada, H. 2000. Intercalibration of LABs in Marine Sediment SRM 1941a and their application as a molecular marker in Narragansett Bay sediments. *Environ. Sci. Technol.* 34, 900-906.
- Hedges, JL; Stern, JH. 1984. Carbon and nitrogen determination of carbonate-containing solids. *Limnol. Oceanogr.* 29, 657–663.
- Huang, C; Chen, F; Zhang, S; Chen, C; Meng, Y; Zhu, Q; Song, Z. 2020. Carbon and nitrogen isotopic composition of particulate organic matter in the Pearl River Estuary and the adjacent shelf. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 246, 107003.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2017. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Available in: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/pesquisa/30/84366?ano=2017>. Accessed date: 02 February 2022.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2021. Demographic Census of Recife city – Pernambuco. Available in: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/panorama>. Accessed date: 20 October 2021.
- Isobe, KO; Zakaria, M; Chiem, N; Minh, L; Prudente, M; Boonyatumanond, R; Saha, M; Sarkar, S; Takada, H. 2004. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. *Water Res.* 38, 2449–2459.
- Kaiser, HF. 1970. A second generation little jiffy. *Psychometrika*, 35, 401–415.
- Kopprio, GA; Dutto, MS; Cardona, JG; Gärdes, A; Lara, RJ; Graeve, M. 2018. Biogeochemical markers across a pollution gradient in a Patagonian estuary: A multidimensional approach of fatty acids and stable isotopes. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 617-626.
- Kowalewska, G; Konat, J. 1997. The role of phytoplankton in the transport and distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in the southern Baltic environment. *Oceanologia* 39, 267–277.
- Lauenstein, G.G., Cantillo, A.Y. 1998. Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project. 1993-1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA. pp. 130-233.

- Lehmann, MF; Bernasconi, SM; Barbieri, A; McKenzie, JA. 2002. Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 3573-3584.
- Liu, K; Xiao, X; Zhang, D; Ding, Y., Li, L; Zhao, M. 2021. Quantitative estimates of organic carbon contributions to the river-estuary-marine system in the Jiaozhou Bay, China. *Ecol. Indic.* 129, 107929.
- Luo, XJ; Chen, SJ; Ni, HG; Yu, M; Mai, BX. 2008. Tracing sewage pollution in the Pearl River Delta and its adjacent coastal area of South China Sea using linear alkylbenzenes (LABs). *Mar. Pollut. Bull.* 56, 158–162.
- Macías-Zamora, JV; Ramírez-Alvarez, N. 2004. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. *Environ. Pollut.* 130, 229-238.
- Maciel, DC; Costa, BVM; Santos, LPS; Souza, JRB; Zanardi-Lamardo, E. 2015a. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkmann Rocco (1973). *Trop. Oceanog. (Online)* 43, 26-37.
- Maciel, DC; Souza, JRB; Taniguchi, S; Bícigo, MC; Zanardi-Lamardo, E. 2015b. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 429-433.
- Maciel, DC; Souza, JRB; Taniguchi, S; Bícigo, MC; Schettini, CAF; Zanardi-Lamardo, E. 2016. Hydrocarbons in sediments along a tropical estuary-shelf transition area: Sources and spatial distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 113, 566-571.
- Maciel, DC; Castro, ÍB; de Souza, JRB; Yogui, GT; Fillmann, G; Zanardi-Lamardo, E. 2018. Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 126, 473-478.
- Magam, SM; Zakaria, MP; Halimoon, N; Aris, AZ; Kannan, N; Masood, N; Latif, MT. 2016. Evaluation of distribution and sources of sewage molecular marker (LABs) in selected rivers and estuaries of Peninsular Malaysia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5693-5704.
- Martins, CC; Bícigo, MC; Mahiques, MM; Figueira, RCL; Tessler, MG; Montone, RC. 2010. Depositional history of sedimentar linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). *Environ. Pollut.* 158, 3355-3364.
- Martins, CC; Cabral, AC; Cintra, SCTB; Dauner, ALL; Souza, FM. 2014. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environ. Pollut.* 188, 71–80.
- Masood N; Zakaria MP; Halimoon N; Aris AZ; Magam SM; Kannan N; Mustafa S; Ali, MM; Keshavarzifard M; Vaezzadeh V; Alkhadher SAA; Al-Odaini NA. 2016. Anthropogenic waste indicators (AWI) particularly PAHs and LABs in Malaysian sediments: application of aquatic environment for identifying anthropogenic pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 102, 160-175.
- Medeiros, PM; Bícigo, MC. 2004a. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP—Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 761-769.
- Medeiros, PM; Bícigo, MC. 2004b. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP—Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 892–899.

- Medeiros, PM; Bícigo, MC; Castelhão, RM; Del Rosso, C; Fillmann, G, Zamboni, AJ. 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77–87.
- Meyers, PA. 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Org. Geochem.* 27, 213 – 250.
- Mook, WG; Tan, FC. 1991. Stable carbon isotopes in rivers and estuaries. In *Biogeochemistry of Major World Rivers*, SCOPE 42, 245–264.
- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2022. Estuarine tutorial. Available at: https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial_estuaries/welcome.html. Accessed date: 19 August 2022
- Noriega, CED; Araujo, M; Lefevre, N. 2013. Spatial and temporal variability of the CO₂ fluxes in a tropical, highly urbanized estuary. *Estuaries and Coasts* 36, 1054–1072.
- Noriega, C; Araujo, M; Lefèvre, N; Montes, MF; Gaspar, F; Veleza, D. 2015. Spatial and temporal variability of CO₂ fluxes in tropical estuarine systems near areas of high population density in Brazil, *Reg. Environ. Chang.* 15, 619–630.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2002. Dodecylbenzene and undecylbenzene (isomers Benzenes, C₁₀-C₁₆ alkyl derivative). Geneva: UNEP, p.79.
- Oliveira, TS; Barcellos, RL; Schettini, CAF; Camargo, PB. 2014a. Processo sedimentar atual e distribuição da matéria orgânica em um complexo estuarino tropical, Recife, PE, Brasil. *J. Integr. Coast.* 14, 399–412.
- Oliveira, DD; Souza-Santos, LP; Silva, HKP; Macedo, SJ. 2014b. Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 373–378.
- Parnell AC; Inger R; Bearhop S; Jackson A. 2008. SIAR: stable isotope analysis in R. Available at: <http://cran.rproject.org/web/packages/siar/index.html>. Accessed date: 15 January 2021.
- PCR (Prefeitura da Cidade do Recife). 2005. Atlas de desenvolvimento humano na cidade de Recife. Available at: <http://www.condepefidem.pe.gov.br/web/condepe-fidem/atlas-metropolitano>. Accessed date: 20 February 2021
- Penteado, JCP; El Seoud, OA; Carvalho, LRF. 2006. Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica, *Quím. Nova* 29, 1038–1046.
- Raymundo, C; Preston, M. 1992. The distribution of linear alkylbenzenes in coastal and estuarine sediments of the Western North Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 24, 138–146.
- Régis, CG; Souza-Santos, LP; Yogui, GT; Moraes, AS; Schettini, CAF. 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 45–55.
- Rinawati; Koike, T; Koike, H; Kurumisawa, R; Ito, M; Sakurai, S; Togo, A; Saha, M; Arifinc, Z; Takada, H. 2012. Distribution, source identification, and historical trends of organic micro pollutants in coastal sediment in Jakarta Bay, Indonesia. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 208–216.
- Rogers, KM. 2003. Stable carbon and nitrogen isotope signatures indicate recovery of marine biota from sewage pollution at Moa Point, New Zealand. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 821–827.

- Santiago, MF; Silva-Cunha, MGG; Neumann-Leitão, S; Costa, KMP; Palmeira, GCB; Neto, FFP; Nunes, FS. 2010. Phytoplankton dynamics in a highly eutrophic estuary in tropical Brazil. *Braz. J. Oceanog.* 58, 189–205.
- Schettini, CAF; Paiva, BP; Batista, RAL; Oliveira Filho, JC; Truccolo, EC. 2016. Observation of an estuarine turbidity maximum in the highly impacted Capibaribe estuary. *Braz. J. Oceanog.* 64, 185–190.
- Schneider, B; Schlitzer, R; Fischer, G; Nothig, E-M. 2003. Depth-dependent elemental compositions of particulate organic matter (POM) in the ocean. *Glob. Biogeochem. Cycles* 17, 1032.
- SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento). 2019. Available in: <http://tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/esgoto>. Accessed in: 06 February 2022.
- Somerfield, PJ; Fonseca-Genevois, VG; Rodrigues, ACL; Castro, FJV; Santos, GAP. 2003. Factors affecting meiofauna community, structure in the Pina Basin, an a urbanized embayment on the coast of Pernambuco, Brazil. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 83, 1209–1213.
- Sophonsiri, C; Morgenroth, E. 2004. Chemical composition associated with different particle size fractions in municipal, industrial, and agricultural wastewaters. *Chemosphere* 5, 691–703.
- Takada, H; Ishiwatari, R. 1990. Biodegradation experiments of linear alkylbenzenes (LABs): isomeric composition of C12 LABs as an Indicator of the degree of LAB degradation in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 24, 86–91.
- Takada, H; Eganhouse, RP. 1998. Molecular markers of anthropogenic waste. In: Meyers, RA (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. John Wiley & Sons, New York, 2883–2940.
- Thornton, SF; McManus, J. 1994. Application of organic carbon and nitrogen stable isotope and C/N ratios as source indicators of organic matter provenance in estuarine systems: Evidence from the Tay estuary, Scotland. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 38, 219–233.
- Tuholske, C; Halpern, BS; Blasco, G; Villasenor, JC; Frazier, M; Caylor, K. 2021. Mapping global inputs and impacts from of human sewage in coastal ecosystems. *PloS one* 16, e0258898.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 1992. Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. In: *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, 20, p.78.
- Wang, JZ; Zhang, K.; Liang, B. 2012. Tracing urban sewage pollution in Chaohu Lake (China) using linear alkylbenzenes (LABs) as a molecular marker. *Sci. Total Environ.* 414, 356–363.
- Wear, SL; Acuña V; McDonald R; Font, C. 2021. Sewage pollution, declining ecosystem health, and cross-sector collaboration. *Biol. Conserv.* 255, 109010.
- Wei, GL; Liu, LY; Bao, LJ; Zeng, EY. 2014. Tracking anthropogenic influences on the continental shelf of China with sedimentary linear alkylbenzenes (LABs). *Mar. Pollut. Bull.* 80, 80–87.
- Zanardi-Lamardo, E; Bícigo, MC; Castro, BM; Miranda, LB; Prósperi, VA. 2000. Southern Brazil. In: Sheppard, C. (Org). *Seas at Millennium: An Environmental Evaluation*. Elsevier Science. 1, 731–747.
- Zanardi-Lamardo, E; Nóbrega, ASC; Santos, RHA; Maciel., DC. 2016. Fontes e níveis de contaminação do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). *Trop. Oceanog. (Online)* 44, 118–131.

- Zhang, K; Wang, JZ; Liang, B; Shen, RL; Zeng, EY. 2012. Assessment of aquatic wastewater pollution in a highly industrialized zone with sediment linear alkylbenzenes. *Environ Toxicol. Chem.* 31, 724–730.
- Zhang, C; Lu, J; Wu, J. 2019. Adsorptive removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by detritus of green tide algae deposited in coastal sediment. *Sci. Total Environ.* 670, 320–327.
- Zimmerman, AR; Canuel, EA. 2001. Bulk organic matter and lipid biomarker composition of Chesapeake Bay surficial sediments as indicators of environmental processes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 53, 319-341.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SM1- Instrumental analysis and quantification LAB

The instrumental procedure followed Martins et al. (2010) and Dauner and Martins (2015). LAB analyses were performed using a gas chromatograph (GC - Agilent Technologies, model 7820) coupled to a mass spectrometer (MS - Agilent Technologies, model 5975C) in selected ion monitoring (SIM) mode. An aliquot of 1 μL of the extract was injected in the splitless mode with an autosampler, with a purge opening time of 0.5 min. The capillary column used was HP-5ms (stationary phase composition: 5% phenylmethylarylenopolysiloxane) with 30 meters in length, 0.25 mm in diameter and 0.25 μm of film thickness. Helium (99.999% purity) was used as carrier gas, with a constant flow of 1.2 mL min^{-1} in the column. GC injector and MS transfer line temperatures were both set to 300 $^{\circ}\text{C}$, while the ion source and quadrupole temperatures were 150 $^{\circ}\text{C}$ and 230 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The oven temperature ramp was set to an initial temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 60 $^{\circ}\text{C}$, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 290 $^{\circ}\text{C}$, isothermal at 290 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 300 $^{\circ}\text{C}$, remaining stable at this temperature for 10 min. The MS was operated with an electron ionization source (ionization energy: 70 eV; emission current: 300 μA).

The homolog series between C_{10} and C_{14} were identified based on individual mass spectrum and retention times, and quantification was performed using the internal standardization method with concentrations ranging from 2.5 to 5000 ng mL^{-1} (UNEP, 1992). LAB isomers were identified using an industrial sample provided by the company Deten® (the only LAB manufacturer in Brazil).

Figure SM1

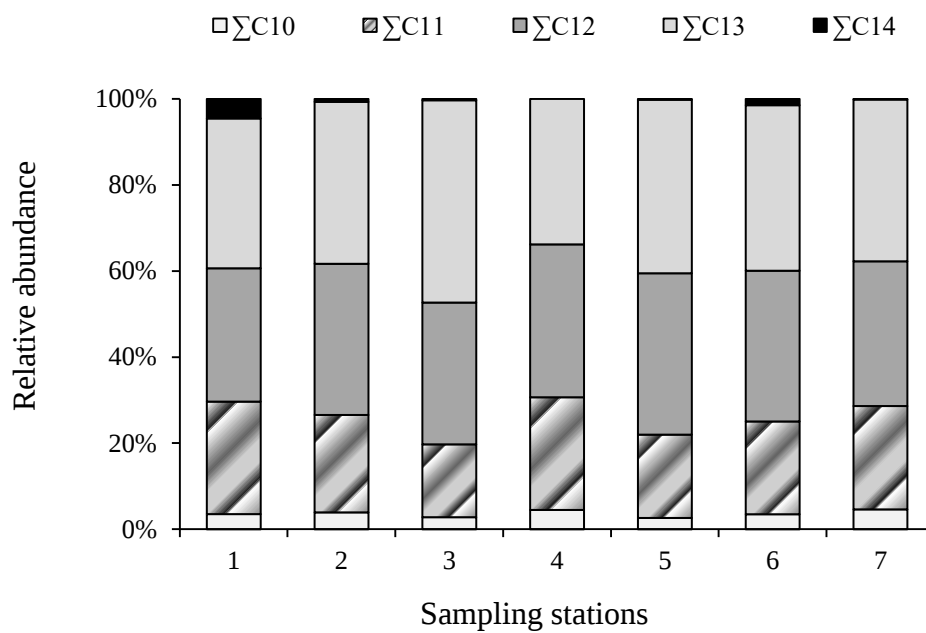


Figure SM1. Relative distribution of linear alkyl benzene (LAB) in surface sediments from Capibaribe Estuarine System.

Figure SM2

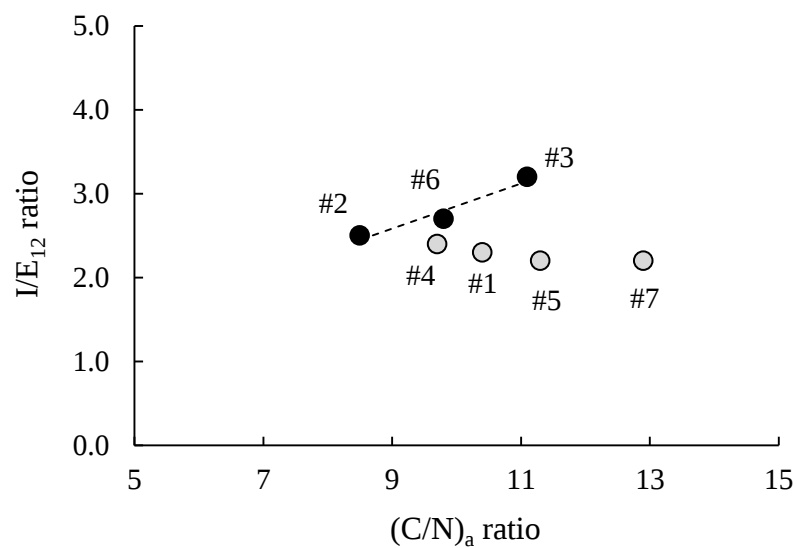


Figure SM2. Biplot of $(C/N)_a$ and I/E_{12} ratios for sediments from CES.

Table SM1

Table SM1. Elemental [(C/N)_a ratio] and isotopic ($\delta^{13}\text{C}$) signature of sediment samples from coastal environments that receive inputs of organic carbon derived from domestic sewage. Values in parentheses represent the mean.

	Sedimentary organic matter parameters			
Study area	OC (%)	(C/N) _a ratio	δ ¹³ C (‰)	Reference
<i>Sedimentary Organic Matter</i>				
Capibaribe Estuarine System (NE Brazil)	0.5 to 2.2 (1.5)	8.2 to 12 (10)	-25.2 to -21.6 (-23.4)	This study
	0.6 to 3.9 (2.6)	7.7 to 22 (10)	-26.5 to -22.5 (-23.6)	Fernandes et al., 1999
Guanabara Bay (SE Brazil)	-----	13 to 18 (15)	-24.3 to -22.3 (-23.1)	Carreira et al. (2002)
Paranaguá Estuarine System (SE Brazil)	0.7 to 4.3 (2.3)	8.2 to 13 (11)	-----	Cabral and Martins, 2018
	0.03 to 3.9 (1.4)	1.1 to 12 (9.4)	-27.4 to -24.9 (-26.3)	Cabral et al.,2019
Babitonga Bay (S Brazil)	0.07 to 3.8 (2.2)	11 to 15 (13)	-24.9 to -22.7 (-24.0)	Barros et al., 2010
Vitoria Bay (SE Brazil)	-----	-----	-27.0 to -24.2 (-25.7)	Varzim et al., 2019
Xiaoqing River-Laizhou Bay (E China)	0.04 to 4.0 (0.7)	-----	-26.7 to -22.1 (-24.6)	He et al., 2018
Dagu River estuary and Jiaozhou Bay (E China)	0.1 to 0.7 (0.4)	8 to 26	-21.8 to -19.7 (-20.9)	Liu et al., 2021
<i>Particulate Organic Matter</i>				
Rivers draining to Guanabara Bay (SE Brazil)		7.3 to 79 (16)	-31.7 to -21.5 (-25.5)	Costa et al. (2018)
	-----	-----	-23.6 to -20.8 (-21.8)	Carreira et al. (2002)

6 MANUSCRITO 2: SEWAGE OUTFLOW AND CONTAMINATION BY LINEAR ALKYL BENZENES AND THEIR ANIONIC SURFACTANT IN A BRAZILIAN TROPICAL URBAN ESTUARY, DURING WET AND DRY SEASONS

Abstract

The Capibaribe Estuarine System (CES) is an important estuarine region located in Northeast Brazil, which despite its intense degradation, is still considered an important ecosystem from an ecological and socioeconomic point of view. Thus, it is essential to carry out studies that assess the specific contribution of sewage to environmental contamination in this area. The present study evaluated the contamination and spatial distribution of LAS and LAB in surface water and sediments of the CES, during dry and wet seasons. The concentration of LAS in water ranged from 0.05 to 1.53 mg L⁻¹ (median = 0.12 mg L⁻¹), characterizing this environment as contaminated by these compounds. LAS concentrations in CES waters were above the limits established by current resolutions, evidencing the potential risk of these compounds for the organisms present there. It was possible to observe a predominance of inputs and dilutions in the study area during the wet season, but there were no significant differences in the concentration of LAS between the dry and wet seasons, except in the stations that are under the direct influence of the Capibaribe River. Sediment contamination by LAB was classified as moderate (concentrations between 200 – 2000 ng g⁻¹) for the two seasons of the year (dry-wet). A substantial increase/decrease in LAB concentrations was observed between the periods. During the dry season the distribution of LAB was mainly regulated by the proximity of sewage sources, while in the wet season the granulometric factor also becomes important. There was no seasonal difference in the degradation of LAB, due to the high temperatures that favor this degradation in both seasons of the year, in addition to the heterotrophic condition of this environment. The highest concentrations of LAS and LAB were recorded in the mid-estuary, where there is a greater influence of the sewage plume and in the zone of maximum turbidity in the region. This study reveals that the region deserves special attention from research and environmental agencies, since it presented LAS concentrations above safe limits. In addition, the results can be used in the efficient elaboration of management plans, which seek to minimize present effects and avoid greater future pollution.

Keywords: molecular markers, water, sediment, seasonal variation, domestic effluents

Introduction

In recent centuries, the world's population has been increasing exponentially and, in parallel, there has been an increasing release of domestic sewage, which is considered one of the main sources of contaminants for coastal regions (Small; Nicholls, 2003; Martins *et al.*, 2008). The introduction of anthropic contaminants may cause ecological, social and economic impacts on ecosystems (Miranda *et al.*, 2002).

Surfactants are among the most consumed organic compounds in the world, making up 15 to 40% of detergents formulation. Therefore, they are used as tracers of contamination by domestic effluents (Scheibel, 2004; Lechuga *et al.*, 2016). Within this group, anionic surfactants are the most common and have been historically used by industries due to their excellent cleaning properties, high foaming power, and high wetting, in addition to their low cost (Pulidindi; Pandey, 2017).

Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) are currently the main worldwide representatives of this subsegment, with an annual production of 2.8 million tons (Cavalcante *et al.*, 2014). In the market since 1964, LAS is produced from a Linear Alkylbenzene (LAB) sulfonation reaction, and emerged as a biodegradable substitute for Alkylbenzene Sulfonates (ABS), (Penteado *et al.*, 2006; Bergé *et al.*, 2018). The LAB reaction has an average yield of 95-99%, resulting in just a small fraction of this compound in the final detergents composition (Bakhtiari *et al.*, 2018). In natural environment, LAB are more resistant to degradation than LAS and, due to their hydrophobic characteristics, they are preferentially studied as biomarkers of sewage in sediments, (Takada, 1998; Magam *et al.*, 2016). On the other hand, LAS are released daily in significant amounts into the environment and has a high solubility (5-20 g L⁻¹). Despite of their high rate of degradation, above 80% under aerobic conditions, they are used as good indicators of water quality (Painter; Zabel, 1989; Cavalcante *et al.*, 2014). Both LAB and LAS consist of a mixture of various homologous, with carbon chain length varying from C10 to C14, and isomers, which differ only in the position of the phenyl or sulfophenyl group to the alkyl chain, for LAB or LAS, respectively.

The detection of sewage in the environment and identification of its sources are extremely important for the health of ecosystems, as it enables environmental management actions aimed at mitigating the problem. The Capibaribe Estuarine System (CES) figures among the coastal areas most impacted by domestic sewage in northeastern Brazil (Arruda-Santos *et al.*, 2023). CES is in the Metropolitan Region of Recife (capital of Pernambuco State) and has a history of disorderly urbanization, being one of the most densely populated

areas in the country, with 3.7 million inhabitants (IBGE, 2021). In addition, there is no effective basic sanitation in the area, with only 33% of the population having urban sewage services (personal communication of a Compesa ombudsman - COMPESA, 2020), resulting in a poor water quality at CES (Travassos *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2010; Flores-Montes *et al.*, 2011). Based on that, the objective of the present study was to investigate the spatial distribution of LAS and LAB in surface water and sediments from CES, respectively, during two seasons of the year (dry and wet).

Materials and Methods

Study area

Recife city has a humid tropical climate with slight seasonal variation in temperature, ranging from 23.9 to 26.6 °C (Schettini *et al.* 2016a), but high variation in monthly cumulative precipitation (MCP)[median 56 and 245 mm month⁻¹ for dry (September-February) and wet (March-August) seasons, respectively; APAC (2023)]. Capibaribe River is the major river that crosses Recife city from West to East with annual discharge ranging from 2 to 30 m³ s⁻¹ during the dry and wet seasons, respectively (Schettini *et al.*, 2016a)]. This river along with Tejipió, Jordão, Pina and Beberibe rivers originate a small (35 km²) tidal estuary (CES; Figure 1) with average annual heights of 1.6 m at neap tide and 2.6 m at spring tide and long water residence time ranging from 7 (wet season) to 25 days (dry season) (Santiago *et al.*, 2010; Noriega *et al.*, 2013; Gaspar *et al.*, 2018). In the last 20 years, the high organic load from domestic sewage to CES increased as observed by continuous monitoring programs in the middle estuary using the biochemical oxygen demand (BOD) as parameter (BOD_{5,20} increased from 6.72 to 23.7 mg L⁻¹; CPRH, 2023). This reflects the low efficiency (average of 59%) of local sewage treatment plants (STPs) in reducing the organic load from domestic sewage (ANA, 2017).

Data of sewage outflow from STPs and mean monthly cumulative precipitation

A data set ($n = 44$) of monthly cumulative sewage outflow (CSO) to CES and MCP in the Recife city was obtained from the local sanitation company (COMPESA; Access to Information Request number 201962647, 2019) and APAC (2023), respectively. The data set encompasses the period from November 2015 to June 2019. CSO from three STPs (Cabanga,

Peixinhos and Mangueira) were grouped according to the season (dry and wet season) in order to evaluate seasonal differences.

Water and sediment sampling

Four sampling campaigns were carried out weekly between October-December 2021 and April-June 2022 in order to collect subsurface water (1 m depth) samples. Triplicate samples from each of the 7 stations described by Arruda-Santos et al. (2023) (Figure 1) were collected during the ebbing phase of spring tides. The samples from station 4 (estuary mouth) were collected at the low tide slacks. The samples were collected using 1 L cleaned amber bottles attached to a stainless-steel support.

Surface (2-4 cm) sediment samples were collected in October 2020 and June 2022 using a stainless-steel van-Veen grab sampler. These samples were kept in precombusted (450 °C for 4 h) aluminum containers and frozen at -22 °C until processing.

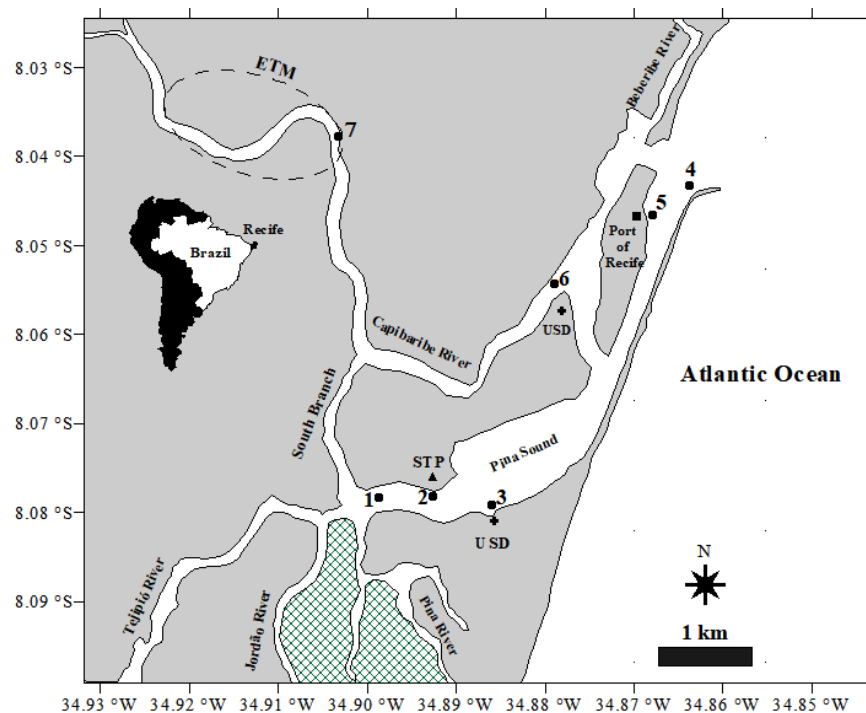


Figure 1: Sampling stations of water and sediment (1-7) within the Capibaribe Estuarine System (CES). Shaded area: Mangrove Park; STP: Cabanga Sewage Treatment Plant; USD: Untreated Sewage Disposal; Dashed circle: area corresponding to the estuarine turbidity maximum (ETM). Font: Arruda-Santos *et al.* (2023).

Sample processing of suspended particulate matter (SPM) and sediment

Aliquots (180-1500 mL) of water samples were filtered through precombusted and weighed Whatman GF/C filters and cellulose filters (both $\varnothing = 47$ mm). GF/C filters were dried (60°C for 24 h) and weighed in order to calculate the SPM concentration (Baumgarten et al., 1996). Cellulose filters were carefully scraped off using stainless-steel spatula in order to remove SPM and then the SPM was placed in glass beakers. After, SPM was dried (60°C for 24 h), grounded and weighed (from 0.3 to 0.8 mg) in tin capsules for particulate organic carbon (POC) determination (see details below). SPM was not decarbonated since previous experiments indicated inorganic carbon content lower than the quantification limit.

Sediments were dried through the freeze-drying process and the grains disaggregated in a mortar with a pestle for granulometric and organic carbon (OC) analysis, with the portion destined for LAB analysis passed through a sieve with a 500 μm mesh (Arruda-Santos *et al.*, 2023).

Grain size

For determination of grain size, aliquots (~ 30 g) of dried sediments were digested with H_2O_2 (10%, v/v) to remove organic matter (OM) and then subjected to wet sieving using a 63 μm sieve to separate coarse and fine sediments (Barbosa; Suguio, 1999). The coarse fraction was then sieved in a shaker and the fine fraction was further fractionated using the pipetting method. The sediments were classified according to their mud content (silt + clay) (Flemming, 2000).

Quantification of particulate and sedimentary OC content

Organic carbon content in SPM (from 0.3 to 0.8 mg) and in aliquots of decarbonated sediments (~ 52 mg) was quantified using a EuroVector elemental analyzer (model EA3000 Single) coupled to a Thermo isotope ratio mass spectrometer (model Delta V Advantage). Quantification of OC was conducted based on an analytical curve ($R^2 \geq 0.995$) using algae IVA33802162 (IVA *Analsentechnik*, C = 45.17%) and sediment B2151 (*Elemental Microanalysis*, C = 7.45%) as reference materials for SPM and sediment samples, respectively.

Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in water

The methodology for LAS quantification was based on the reaction between alkylbenzene sulfonates with methylene blue, a cationic dye that reacts with anionic surfactants to form a pair of low polarity and intensely colored ions, capable of solvent extraction and spectrometric measurement (ABNT, 1989; Apha, 1998; Koga *et al.*, 1999). In summary, a 300 mL aliquot of each sample was filtered (GF/C glass fiber filter, 47 mm, Waterman) to remove suspended materials, followed by addition of 25 mL of methylene blue solution (100 mg L⁻¹). Three sequential extractions were performed with 8 mL of chloroform each. The organic phase was washed with 50 mL of acid saline solution (Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate + Sulfuric Acid; 50,000 mg L⁻¹) to remove possible interferences. Finally, the extracts were collected and made up to 25 mL with chloroform. Concentration was determined after analysis by ultraviolet (UV) and visible (VIS) spectroscopy (SpectraMax M3 Molecular Devices) at 655 nm.

Linear alkylbenzenes (LAB) in sediment

The extraction and quantification of LAB in sediments followed the procedure proposed in the literature (UNEP, 1992; Martins *et al.*, 2014; Arruda-Santos *et al.*, 2023). Briefly, an aliquot of approximately 15 g of sediment was weighed and samples were spiked with 100 µL of the surrogate standard 1-C₁₂-LAB (1000 ng mL⁻¹). The samples were submitted to extraction in a Soxhlet system, using a mixture of dichloromethane:n-hexane (1:1, v/v) for about 8 h. The extracts were eluted with 10 mL of n-hexane through an adsorption chromatography column containing 3.2 g of silica gel and 1.8 g of alumina (5% deactivated). The eluates were concentrated down to 1 mL on a rotary evaporator and 100 µL of internal standard (1-C₁₉-LAB, 1000 ng mL⁻¹) was added to all extracts. All standards were purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (purity >98%) (St. Louis, MO, USA).

The 26 LAB were analyzed using a gas chromatograph (GC - Agilent Technologies, model 7820) coupled to a mass spectrometer (MS - Agilent Technologies, model 5975C) in the selected ion monitoring (SIM) mode. The GC was equipped with an HP-5 ms fused silica capillary column (30 m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). Helium was used as carrier gas with a constant flow rate of 1.2 mL min⁻¹ in the column and 1 µL of the extract was injected in splitless mode with an autosampler. GC injector and MS transfer line temperatures were both set to 300 °C, while the ion source and quadrupole temperatures were

150 °C and 230 °C, respectively. The oven temperature ramp followed the following programming: initial temperature 40°C, 20°C/min up to 60°C, 5°C/min up to 290°C, isothermal at 290°C for 5 min, 10°C/min up to 300°C, remaining stable at this temperature for 10 min. The MS was operated with an electron ionization source (ionization energy: 70 eV; emission current: 300 μ A).

Quality assurance and quality control

Analytical precision (one standard deviation of duplicate samples) for OC content ranged between 0.003 to 3.06%. No peaks were detected in capsule blanks and there was no cellulose contamination in scraped SPM. LAS concentrations in water were calculated based on an analytical curve prepared with sodium dodecylbenzenesulfonate (C_{12} -LAS $CH_3(CH_2)_{11}C_6H_4SO_3Na$), the main representative of the group, in a concentration range between 0.2 and 4.5 mg L⁻¹. Precision was determined using triplicates of seawater with distilled water (salinity ~20) spiked with sodium dodecylbenzenesulfonate (100 mg L⁻¹) (coefficient of variation ranging from 1.1 to 5.7%). The method detection limit (0.04 mg L⁻¹) was three times the standard deviation of the field blank concentrations (Quevauviller *et al.*, 1992).

The homolog series of LAB between C_{10} and C_{14} were identified in sediments based on individual mass spectrum and retention times, and quantification was performed using the internal standardization method (UNEP, 1992), in a concentration range between 2.5–5000 ng mL⁻¹. LAB isomers were identified using an industrial sample provided by the company Deten® (the only LAB manufacturer in Brazil). Quality control was performed based on analysis of the procedure blank, recovery of surrogate standard, and fortified duplicate samples. The trace concentrations found in the blank were subtracted from the samples. The recovery of surrogate standard (1- C_{12} -LAB) ranged from 40.5% to 83%. Duplicate samples were fortified with a solution containing all analytes and the recovery of individual compounds ranged from 64% to 93%. Coefficient of variation for these analytes ranged from 3.2 to 10.7 %. The limit of quantification (LQ) was established from the ratio between the most diluted concentration of the analytical curve to the mass of sediment extracted, resulting in 0.17 ng g⁻¹ dry weight (dw) for all analytes. In this study, all quality control parameters were within the acceptable limits proposed for international environmental monitoring programs (e.g., Lauenstein and Cantillo, 1998).

Diagnostic ratios (LAB)

The ratio between concentrations of internal (phenyl group at positions 5 and 6) and external (positions 2, 3 and 4) isomers (I/E ratio) were calculated using the equation 1 in order to evaluate the LAB degradation (Takada; Ishiwatari, 1990):

$$I/E_n = \frac{6-C_n + 5-C_n}{4-C_n + 3-C_n + 2-C_n} \quad (1)$$

where “n” is the number of alkyl carbons and numbers 2, 3, 4, 5, and 6 refers to the position in which the phenyl group binds to the n-alkane.

Laboratory and field studies have shown that external isomers degrade faster than internal isomers (Eganhouse *et al.*, 1983; Takada; Ishiwatari, 1990). Therefore, I/E_n ratio tends to increase as biodegradation progresses. This ratio is also used to assess the degree of treatment of domestic sewage: none or not adequate treatment results in a I/E_n ratio lower than or close to 1; secondarily treated effluents results in higher I/E_n ratio, varying from 2 to 7, mainly due to facilitated microbial degradation (Takada; Eganhouse, 1998). These authors also suggested that I/E_n ratio is properly related to the degree of LAB degradation (D), calculated using the following logarithmic equation (equation 2):

$$D (\%) = 81 \times \log (I/E_n) + 15 \quad (2)$$

The I/E_n ratio is positively and exponentially correlated with the percentage of degradation of the LAB, that is, the greater the degradation of LAB, the greater I/E_n ratio (Takada; Eganhouse, 1998).

Statistical analysis

Mann-Whitney unilateral ($\alpha/2 = 0.05$) test was used to compare medians CSO, SPM concentrations, POC contents, LAS and LAB concentrations, in addition to LAB degradation, between dry and wet season. Spearman's order correlation analysis ($\alpha = 0.05$) was used to assess whether the CSO of the ETEs increases significantly with the MCP in the city of Recife and to assess whether there is a relationship between SPM/OC versus LAS. Statistical analyses were performed using Minitab and BioEstat 5.0 softwares.

Results

Sewage outflow from STPs to CES

Sewage outflow from Cabanga, Peixinhos and Mangueira STPs ranged from 0.23 to 0.79 m³ s⁻¹ (median: 0.32 m³ s⁻¹), from 0.11 to 0.54 m³ s⁻¹ (median: 0.28 m³ s⁻¹) and from 0.03 to 0.06 m³ s⁻¹ (median: 0.04 m³ s⁻¹), respectively, from November 2015 to June 2019 (Figure SM1). Regarding the median sewage outflow was significantly higher during the wet season than that during the dry season for Peixinhos (Mann-Whitney, U test = 126; p = 0.003) and Mangueira (Mann-Whitney, U test = 147; p = 0.01) STPs (Figure SM1). There was no significant difference in the seasonal sewage outflow from Cabanga STP (Mann-Whitney, U test = 205; p = 0.19) (Figure SM1). Cumulative sewage outflow (CSO) ranged from 7.10 x 10⁴ m³ month⁻¹ (Mangueira STP) to 2.04 x 10⁶ m³ month⁻¹ (Cabanga STP). CSO for each STP was significantly and positively related to monthly cumulative precipitation (MCP) in the Recife city (Figure SM2): Mangueira (rs = 0.41, p = 0.005, n = 44), Peixinhos (rs = 0.55, p = 0.0001, n = 44) and Cabanga (rs = 0.51, p = 0.003, n = 31) (Figure SM2). However, for STP Cabanga, data from June 2018 to June 2019 did not show this relationship (Figure SM2). During these months, there was an increase in CSO, but this was not related to rainfall, and this may be related to an improvement in the city's sewage collection by this STP during this period.

Water

The SPM concentrations ranged from 16.7 to 144 mg L⁻¹ (median: 58.7 mg L⁻¹) and from 23.8 to 80 mg L⁻¹ (median: 56.3 mg L⁻¹) during the dry and wet season, respectively (Figure 2A). There was no significant difference in SPM between the studied periods (Figure 2A). In the dry season, POC content ranged from 12.7 to 35.5% (median: 22.6%) and in the wet season varied from 3.93 to 39.1% (median: 15.1%) (Figure 2B). Unlike SPM, the POC in dry season was significantly higher than that in wet season (Figure 2B). POC was not significantly related to SPM concentration during the dry (rs = -0.23, p = 0.32, n = 21) and wet season (rs = -0.10, p = 0.61, n = 28).

Concentrations of LAS along the CES ranged from 0.05 to 1.53 mg L⁻¹ (median = 0.13 mg L⁻¹) and from 0.05 to 1.25 mg L⁻¹ (median = 0.11 mg L⁻¹) during the dry and wet seasons, respectively (Figure 3). High median LAS concentrations (higher than 0.2 mg L⁻¹)

were observed in stations under influence of sewage plume from Cabanga STP (St. #2) and in the river's confluence (St. #1) at both seasons, and in the St# 3 during the wet season (Figure 3). Intermediate median LAS concentrations (from 0.11 to 0.2 mg L⁻¹) were observed in the middle estuary of the Capibaribe River in the Sts. #3, #6 and 7 during the dry season (Figure 3). In contrast, low median LAS concentrations (< 0.11 mg L⁻¹) were observed in the lower estuary of CES (Sts. #4 and #5) at both seasons and in the middle estuary of Capibaribe River (Sts. #6 and #7) during the wet season (Figure 3). LAS concentrations in the middle estuary of Capibaribe River (Sts. #6 and #7) and in the lower estuary (St. #4) were significantly higher during the dry season than those during the wet season (Figure 3). There were no significant differences between seasons for the other stations (Figure 3). In spite of this, during wet season, higher concentrations were observed at Sts #2 and #3 (Figure 3). LAS concentrations were significantly, positively related to SPM (Spearman's rank coefficient; $r_s = 0.49$, $p = 0.014$, $n = 24$) and POC (Spearman's rank coefficient; $r_s = 0.61$, $p = 0.007$, $n = 18$) concentrations during the dry season after the exclusion of some LAS outliers (Figure SM3A, B). In contrast, there was no significant relationship between these parameters during the wet season (Figure SM3C, D).

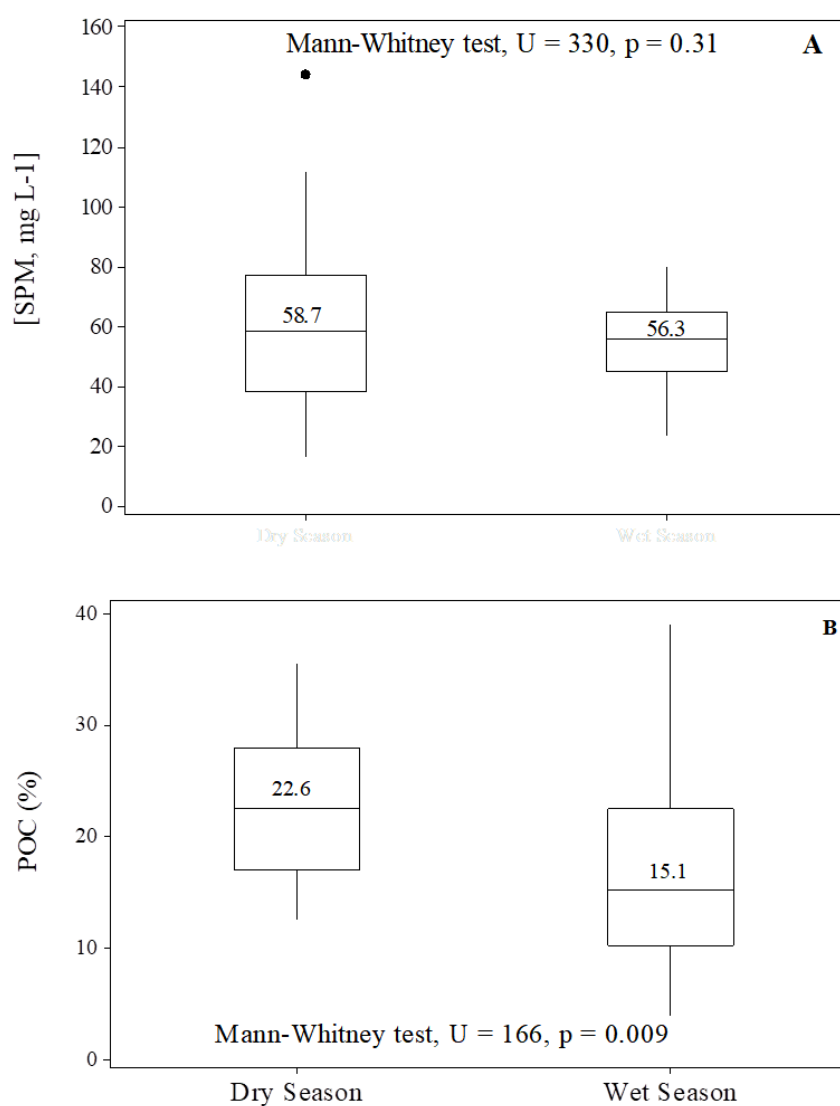


Figure 2. Boxplot with particulate matter in suspension (SPM, mg L⁻¹) (**A**) and particulate organic carbon (POC, %) (**B**) in waters from Capibaribe Estuary System – NE Brazil, during the dry and wet seasons. Black dots: outlier.

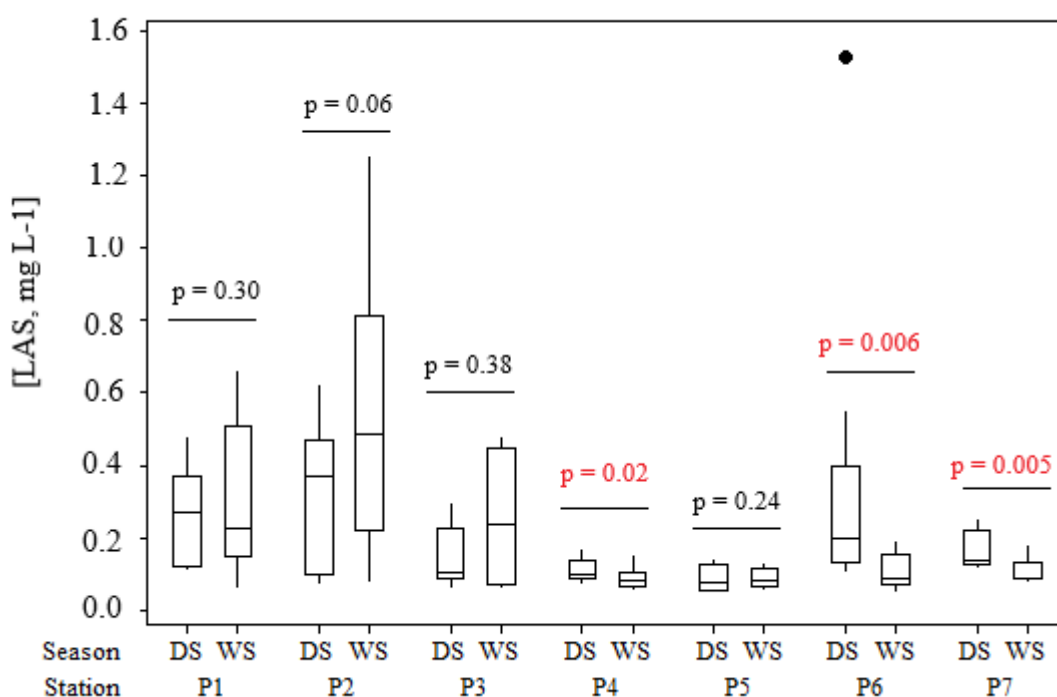


Figure 3. Boxplot of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS, mg L⁻¹) in water samples from Capibaribe Estuary System collected at 7 stations during dry (October to December/2022) and wet (April to June /2022) seasons. Black dot: outlier. DS: Dry season; WS: Wet season. Data in red means that they are statistically different.

Sediment

Sedimentary parameters (mud and OC contents) and total LAB concentrations (Σ LAB) of samples collected during the dry season (October 2020) have already been published (Arruda-Santos et al., 2023). Sediments collected during the wet season (June 2023) exhibited mud content ranging from 0.17 to 98% (median: 66.3%) and OC content ranging from 0.43 to 2.61 (median: 1.91%) (Table 1). The St. #1 was classified as sand (<5% mud), St. #2 as muddy sand (25-50% mud), St. #3 as sandy mud (50-75% mud) and St. #4 as slightly muddy sand (5-25% mud) (Flemming, 2000). The highest mud contents were recorded at St. #5 being classified as slightly sandy mud (75-95% mud), and at Sts. #6 and #7 with a mud >95% (classified as mud) (Table 1).

Relative to Σ LAB ranged from 91 to 2489 ng g⁻¹dw (median: 501 ng g⁻¹ dw; Figure 4). This median was lower than that observed during the dry season (783 ng g⁻¹ dw; Arruda-Santos et al., 2023). Σ LAB was predominantly composed by C₁₃ and C₁₂ homologs (mean of 38 ± 3% and 34 ± 1%, respectively), followed by C₁₁ (mean 24 ± 2%), C₁₀ (mean 4 ± 1%), and C₁₄ (mean 0.2% ± 0.1%) (Table SM1). The same pattern was also observed for sediments collected in the dry season (Arruda-Santos et al., 2023). The log Σ LAB was significantly and

positively related to the muddy fraction (excluding St. #2) (Spearman rank coefficient; $r_s = 0.83$; $p = 0.04$; $n = 6$) and sediment OC content (Spearman rank coefficient; $r_s = 0.88$, $p = 0.008$, $n = 7$). This contrasts with the result observed during the dry season, when $\log \Sigma \text{LAB}$ was not significantly related to either of these two sedimentary parameters (Arruda-Santos *et al.*, 2023).

Table 1. Sedimentary mud and organic carbon (OC) contents of samples collected during the dry season (DS) and wet season (WS). Group of samples according to localization in the Capibaribe Estuarine System (CES) (Arruda-Santos *et al.*, 2023). Legend: ETM = estuarine turbidity maximum.

Groups	Mud (%)		OC (%)	
	DS	WS	DS	WS
(G4) ETM (#7)	13.1	91.5	1.05	2.61
(G2) Close to sewage sources				
#6	21.7	83.7	2.24	2.05
#3	40.8	63.1	1.91	1.91
#2	16.6	41.9	1.06	2.53
(G1) Lower estuary				
#4	96.0	20.4	1.56	0.85
#5	99.2	91.1	1.91	1.68
(G3) River's confluence (#1)	7.60	0.17	0.55	0.43

There was observed an interesting seasonal variation of sedimentary ΣLAB (Figure 4). Sediments from ETM zone and close to sewage sources showed ΣLAB concentrations during the wet season higher than those during the dry season, except St. #3 (Figure 4). In sediments from the lower estuary and from the river's confluence, there was no clear pattern for seasons (Figure 4). Comparing the groups, it is possible to observe important differences in sedimentary ΣLAB concentrations (Figure 4). The groups 4 (ETM zone) and 2 (close to sewage sources) exhibited median ΣLAB concentrations (1499 and 1131 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$, respectively) higher than those in the other groups (319 and 189 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ for groups 1 and 3, respectively).

Ratios I/E were calculated for the most abundant LAB groups and varied from 1.4 to 2.0 (I/E_{11}), from 1.9 to 3.4 (I/E_{12}) and from 2.5 to 4.9 (I/E_{13}) (Table SM1). Degradation rate of LAB ranged from 27 to 43% for C11, from 38 to 58% for C12 and from 47 to 71% for C13 (Table SM1). The overall median rate was 47%. There is no significant difference in the degree of degradation of these compounds between dry (data from Arruda-Santos *et al.*, 2023) and wet (present study data) seasons (Mann-Whitney, U test= 0.79, $p = 0.43$).

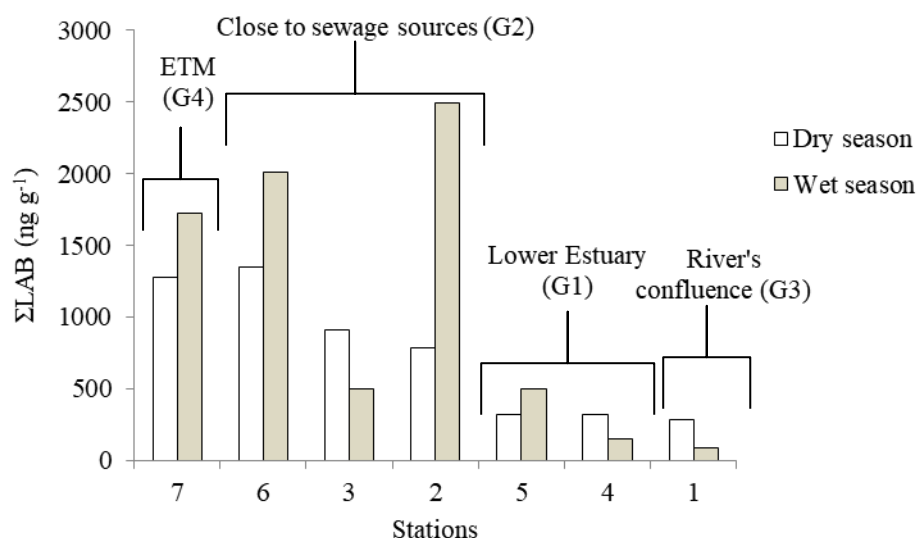


Figure 4. Total Linear Alkylbenzenes (Σ LAB) concentrations in sediments samples from Capibaribe Estuarine System collected from 7 stations during dry season (October/2020, data from Arruda-Santos et al., 2023) and wet season (June/2022).

Discussion

Seasonal outflow of sewage to CES

Median sewage outflow from STPs to CES (ranging from 0.04 to 0.32 m³ s⁻¹) was high when compared with the discharge observed during 95% of the time (Q_{95}) for the rivers (Capibaribe, Tejiþiþ and Beberibe) draining into estuary. Q_{95} was higher than or equal to 0.45 m³ s⁻¹ for Capibaribe River, 2.9 x 10⁻³ m³ s⁻¹ for Tejiþiþ River and 4.3 x 10⁻³ m³ s⁻¹ for Beberibe River (ANA, 2017). The major river (Capibaribe) exhibits a median discharge of 1.42 m³ s⁻¹ during the dry season (Schettini et al., 2016b). In this season, the median sewage outflow from one point source (Cabanga STP) was equivalent to about 22% of the Capibaribe River discharge. This indicates that rivers draining into CES have a very limited potential to dilute effluents from STPs during low river discharge periods and the ebbing phase of semidiurnal tidal cycles (period of 12.41 hours; Schettini *et al.*, 2016b). Thus, the tidal prism (i.e., the volume of seawater that flows into estuary during the flooding phase) is the major force that dilutes effluents from STPs in the CES. In the river's confluence area of CES (Figure 1), the tidal prism ranges between 189 m³ s⁻¹ during the neap tide and 308 m³ s⁻¹ during the spring tide.

Sewage outflow from STPs to CES varies seasonally according to the monthly cumulative precipitation in the Recife city (Figure SM2). Recife is a highly urbanized city (65% of urban area) and it has a large network (1.558 km; PCR, 2017) of underground pipelines that transport the urban drainage to channels and directly to CES. An unknown extension of these underground pipelines is illegally connected to the basic sanitation system, increasing the outflow from STPs to CES and decreasing the efficiency of sewage treatment (COMPESA, 2023).

Contamination by LAS of surface waters from CES

The significant correlation between LAS and SPM/POC concentrations observed during the dry season probably reflects the eutrophication induced by the release of nutrient-rich domestic sewage. At CES, primary productivity during the dry season is high ($92 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Feitosa and Passavante, 1991) since there is a low riverine-dilution of nutrient-rich sewage. During the wet season, this relationship (LAS vs. SPM/POC and likewise the induction of primary productivity by sewage input) is masked by the increase in river flow and surface water turbidity, diluting sewage and reducing productivity primary planktonic ($9.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Feitosa; Passavante, 1991).

The observed concentration range at CES (0.05 to 1.53 mg L^{-1} , median 0.12 mg L^{-1}) was similar to those reported for other Brazilian areas considered contaminated by detergents, such as Santos Estuary -Brazil (0.11 - 0.97 mg L^{-1} , median 0.33 mg L^{-1} ; Silveira *et al.*, 1982), Cananéia Estuary - Brazil (0.15 - 8.47 mg L^{-1} , median 0.26 mg L^{-1} ; Aïdar *et al.*, 1997), Macacu River – Brazil (0.01 - 0.16 mg L^{-1} , median 0.04 mg L^{-1} ; Eichhorn *et al.*, 2002). In a world scenery CES is comparable Sea Mediterranean in the Fos Gulf (0.2 - 0.8 mg L^{-1} ; Benon *et al.*, 1976) and in Triesti Gulf (0.15 – 0.8 mg L^{-1} ; Majori *et al.*, 1968), and less contaminated than Houay Mak Hiao River – Vietnam (2.0 - 5.0 mg L^{-1} ; Whelan *et al.*, 2007).

In the CES, the LAS concentrations mainly reflect the inefficient removal of LAS by primary sewage treatment in Cabanga STP (ANA, 2017) and the high use of detergents by urban population of Recife. Based on sewages arriving at Mangueira STP, the untreated domestic effluent from urban population of Recife exhibits average LAS concentrations of 4.8 ± 0.8 and $3.2 \pm 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ during dry and wet seasons, respectively (Bonfin *et al.*, 2016). The low concentrations of LAS in the lower estuary of CES reflect the high dilution by tidal prism, as mentioned earlier.

The main seasonal differences in LAS concentrations were observed at stations under the influence of the plume (Sts. #1, #2, #3 and #6) and at the ETM station (St. #7) (Figure 3). During the wet season, a dilution of contaminants is expected due to the increased flow of rivers and estuaries by rainwater (Montuori; Triassi, 2012; Lemos *et al.*, 2014). On the other hand, rain tends to increase the urban drainage, as well as the flow of sewage released by ETEs (Figure SM1), increasing the entry of LAS into the CES. Therefore, there is competition between the dilution and entry processes, what could explain the wider variation between replicates samples during the wet season. On Sts. #2 and #3 there was a considerable increase in LAS concentrations in the wet season (Figure 3), probably resulting from the increase in flow, mainly from the ETE Cabanga, therefore the predominant input factor in these stations. In contrast, at Sts. #6 and #7, there was a significant reduction in LAS concentration with the dry-wet shift (Figure 3), and this probably reflects the dilution by the increase in the flow of the Capibaribe river, whose average increases considerably in the dry period ($1.42 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) for the wet season ($11.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) (Schettini *et al.*, 2016b). St. #1, an influence of the dilution factor was also observed (Figure 3), but in a much smaller proportion, probably due to the increase in the flow mainly of the Tejiþiþ river, during the wet season. The lower estuary does not show a defined seasonal pattern, probably due to the greater oceanic influence.

The European Union and Austria have defined limits for LAS concentration in surface water, as 0.35 and 0.27 mg L^{-1} , respectively (Waters; Feijtel, 1995; Clara *et al.*, 2007). There is no regulations or directives in Brazil about safe limits of LAS in effluents and surface water, but just for the total concentration of anionic surfactants, determined by the method of active substances to methylene blue (MBAS). The National Council for the Environment - CONAMA (BRASIL, 2005; 2011) proposed that the concentration of MBAS species in saline and brackish waters should not exceed 0.2 mg L^{-1} . For treated effluents, no limit has been set for these substances (BRASIL, 2005; 2011). In the present study, some stations exceeded those proposed concentrations. These compounds are highly toxic (Verge *et al.*, 2001; Venhuis; Mehrvar, 2004) and can threaten the health of environment, causing significant losses of biodiversity and water quality in the region. Concentrations of LAS higher than 0.36 mg L^{-1} has a negative impact on survival of heterotrophic and ciliated nanoflagellates (Fairchild *et al.*, 1993). Concentrations between 0.02 and 1.0 mg L^{-1} of LAS may cause damage to the functioning of the gills of fish, causing excess secretion of this organ (Venhuis and Mehrvar, 2004). Studies have reported alterations in swimming patterns, locomotor

activity, and changes in exploratory and social behavior in fish exposed to concentrations at 2.5 mg L^{-1} or higher (Barbieri *et al.*, 2005; 2008). In addition, the accumulation of these substances in water bodies can cause a decrease in dissolved oxygen, reduction in light permeability and water surface tension, and even increase the concentrations of other pollutants, causing an impact on the aquatic environment and possibly in organisms (Haigh, 1996; Penteado *et al.*, 2006). This study did not evaluate toxicity upon organisms but such concentrations suggest that some effects may be occurring.

Contamination by LAB in surface sediments from CES

The significant correlation between LAB and mud and OC content, confirm that grain size is an important factor for the accumulation of these contaminants. Similar correlation was also recently observed for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) accumulation in a tropical estuary (Arruda-Santos *et al.*, 2018). This phenomenon was not observed in the dry season (Arruda-Santos *et al.*, 2023), where the highest concentrations of LAB were found in sandy sediments, with proximity to sewage sources being more important than granulometric factors.

Total LAB concentrations in sediments ranged from 287-1349 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ (Median: 783 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) in the dry season (Arruda-Santos *et al.*, 2023), and from 91.2 to 2489 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ in the wet season (median: 501 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) (Figure 4). Sediments from both seasons are classified as moderately contaminated, according to the proposed four levels: low ($< 200 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), moderate (200 – 2000 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$), high (2000 – 6000 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$), and very high ($> 6000 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) (Arruda-Santos *et al.*, 2023). Exceptions were at Sts. #2 and #6, wet season, classified as highly contaminated (Figure 4).

The highest concentrations were recorded in the wet season, with a significant increase in stations influenced by sewage plume (Group G2 - Sts. #2 and #6) and within the ETM (Group G4 - St. #7) (Figure 4). At these sites there was also an increase in the mud and OC contents (Table 1), suggesting a modification of the matrix. This could be resultant of bottom disturbance due to turbulent water caused by rain, in addition to the increased outflow from STPs (Figure 5). The probability of mistakes during sampling is low because every local was selected with the aid of a GPS.

The St. #2 is located in front of Cabanga ETE (Figure 1). The increase in LAB contamination (218%) at this station is probably due to the increased outflow of this ETE during the wet season (Figure SM1), as also observed in water for the LAS. This seasonal

pattern of surfactant concentration in sediments, close to a STP, was also observed at Guadalete estuary, Spain (Lara-Martin *et al.*, 2010). Furthermore, the increase in mud content (43%) and OC (2.53%) during the wet period may have influenced a greater LAB retention in the sediments from this station.

St. #6 is located in front of an untreated sewage source. The highest concentration of Σ LAB (49%) during the wet season, probably to be related to increased discharge of the Capibaribe and Beberibe rivers in this period. These rivers are visibly affected by human action, mainly due to the release of urban effluents (Araújo Freitas *et al.* 2018). Furthermore, the deposition of these contaminants is favored by the increase in the sludge content, from 22% (dry) to 90% (wet).

The St. #7 is located within the ETM. The increase in Σ LAB (35%) in relation to the dry season in this area, probably related to the increase in the flow of the Capibaribe River, associated with the tidal cycle, which carries contaminants from the lower to upper portion of the estuary. Due to the characteristics of the ETM, these compounds are retained in the water column, and are subsequently deposited in the sediments (Arruda-Santos *et al.*, 2023). As in the other seasons, the high content of mud and OC recorded in the wet season (Table 1) may also have influenced the retention of these contaminants in the area.

Despite St. #3 being under the influence of the sewage plume (Group G3), an inverse pattern was observed than those reported in Sts. #2 and #6 (Figure 4). This season, showed a 45% reduction in LAB concentration during the wet season (Figure 4), although the proportion of sludge increased (Table 1). Since the hydrodynamics changed during wet season, it is possible that surficial sediments were removed and dispersion and transport of SPM were favored, avoiding new contamination. This hypothesis is corroborated by the fact that LAS in waters from this site figured out in the highest concentrations, but it was not deposited in sediments.

In general, the confluence and lower estuary stations showed the lowest concentrations. However, comparing the periods it was seen that St. #1 recorded a lower concentration during the wet season ($91.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) compared to the dry season ($286 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). This is probably related to the very low level of mud (0.2%) reported in the region, which does not favor the accumulation of these contaminants (Arruda-Santos *et al.*, 2023). In addition, it is an area with strong turbulence (due to tidal action) and low depth, which difficult the adsorption and deposition of these compounds.

St. #4 lower LAB contamination was also observed in the wet period, and this may be associated with local hydrodynamics, since the strength of the tide and currents favor dispersion and transport contaminants to more sheltered areas of the port and/or interior of the estuary (Maciel *et al.*, 2015).

On the other hand, St. #5 showed a higher concentration of these contaminants during the wet season (Figure 4). This is probably related to a greater accumulation of sewage observed during sampling in this more sheltered area of the port, possibly coming from the innermost areas of the estuary. Contaminants being adsorbed and/or deposited in the sediments probably were favored by the grain size factor (98% mud).

Degradation processes as well as concentrations of contaminants in wastewater and aquatic environments are strongly dependent on environmental factors such as precipitation, temperature, and/or salinity (Traverso-Soto *et al.*, 2014). In the case of degradation, Temperature is the most relevant factor to degradation and it is expected to vary depending on the period of the year (Traverso-Soto *et al.*, 2014). Its influence was observed in laboratory experiments with LAS degradation increasing in summer temperatures (25°C) compared to winter (10°C) (León *et al.*, 2004; León *et al.*, 2011). Same pattern was observed in estuaries (Lara-Martín *et al.*, 2010). This effect was not observed in the CES, which showed a high degree of degradation (I/En ratio > 2) for dry (Arruda-Santos *et al.*, 2023) and wet (Table SM1) periods. This is probably due to the constant high temperatures of surface water (26 - 30 °C) regardless of the season of the year (Noriega *et al.*, 2015), which can favor the degradation of LAB, in addition to the heterotrophic conditions observed in the CES (Noriega *et al.*, 2013), which can also stimulate degradation. Another possibility, discussed previously in details (Arruda-Santos *et al.*, 2023), is that degradation could take place before sewage being released into the estuary, and compounds might be preserved in anoxic sediments (Somerfield *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2021a).

Toxicity of LAB is low and do not present major risks to biota (OECD, 2002), but the main point is that the occurrence of these compounds indicates the presence of sewage, which commonly carries pathogenic microorganisms, in addition to several potentially toxic contaminants (metals, drugs, aromatic hydrocarbons, among others), which might endanger the health of ecosystems and local population. The complexity of chemical reactions that occur in a natural environment is increased in the presence of organic matter (Artifon *et al.*, 2019), reinforcing the idea that these organic compounds, although with low toxicity, can

favor complex reactions or processes of adsorption and /or retention of other compounds with greater toxicity.

Conclusion

The Capibaribe Estuarine System is chronically impacted by surfactants from urban effluent. The surface waters at CES can be considered polluted by LAS with concentrations above the limits established by current resolutions, evidencing the potential risk of these compounds to local organisms. Seasonal differences in the water matrix were clearly observed only at stations under high water river flux influence, where there was a decrease in LAS concentration during the wet season. For the other stations, it seems there are a competition between dilution process (decreasing LAS) and urban runoff (increasing LAS). Sediments from CES are moderately contaminated by LAB, CES sediments are moderately contaminated by LAB, with substantial increases/decreases in concentrations between the studied periods. No seasonal difference was observed in degradation processes. The distribution of both LAS and LAB are mainly related to the proximity of the source (sewage plume), presence of the ETM, and contamination is influenced by the hydrodynamics. In view of current data and potential toxicity of LAS, it is essential to increase the expansion of sewage treatment capacity and coverage in the region in order to reduce contamination of this estuary.

References

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) 1989. **Água - Determinação de surfactantes aniônicos pelo método espectrofotométrico do azul-demetileno**, Rio de Janeiro - RJ, p.7.
- Aidar E, Sigaud-Kutner TCS, Nishihara L, Schinke KP, Braga MCC, Farah RE, Kutner MBB. 1997 Marine phytoplankton assays: effects of detergents. *Mar Environ Res* 43,55–68.
- Almeida, M.G., Rezende, C.E., Souza, C.M.M., 2007. Variação temporal, transporte e partição de Hg e carbono orgânico nas frações particulada e dissolvida da coluna d'água da bacia inferior do rio Paraíba do Sul, RJ, Brasil. *Geochim. Brasiliensis* 21, 111–128.
- ANA (Agência Nacional das Águas). 2017. Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas.
- APAC (Agência Pernambucana de Águas e Climas. 2023 Série histórica do monitoramento pluviométrico mensal na cidade de Recife (1980-2023). Available in: <http://old.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>. Accessed in: 14 April 2023.

- Apha, 1998. American Public Health Association – **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, New York, 20 ed.
- Araújo, AM; Mineiro, ALB; Cantalice, JR de B. 2011. Estimativa do potencial de sedimentação e erosão: caso Manguezal do Pina, Recife (PE). Eng. Sanit. Ambient. 16, 133–140.
- Araújo Freitas, JB; Cabral, JJDSP; Luiz, A; Paiva, R; Albuquerque, TBV; Nascimento Silva, NB. 2018. Qualidade de água de um trecho urbano do Rio Beberibe na Região Metropolitana de Recife.
- Arruda-Santos, RH; Schettini, CAF; Yogui, GT; Maciel, DC; Zanardi-Lamardo, E. 2018. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. Sci. Total Environ. 624, 935–944.
- Arruda-Santos, RH; Costa, BVM; Carvalho, PSM; Zanardi-Lamardo, E. 2023. Sewage contamination assessment in an urbanized tropical estuary in Northeast Brazil using elemental, isotopic and molecular proxies. Environmental Pollution, 317, 120726.
- Artifon, V; Zanardi-Lamardo, E; Fillmann, G. 2019. Aquatic organic matter: classification and interaction with organic microcontaminants. Sci. Total Environ. 649, 1620-1635.
- Bakhtiari, AR; Javedankherad, I; Mohammadi, J; Taghizadeh, R. 2018. Distribution of linear alkylbenzenes as a domestic sewage molecular marker in surface sediments of International Anzali Wetland in the southwest of the Caspian Sea, Iran. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 20920-20929.
- Barbieri, E. 2005. Efeito do LAS-C12 (dodecil benzeno sulfonato de sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da tainha (*Mugil platanus*). Atlântica 27, 49-57.
- Barbieri, E. 2008. Efeito dos Surfactantes DSS e LAS-C12 sobre o Camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensi*, Pérez-Farfante, 1967). J. Braz. Soc. Ecotox. 3, 35-40.
- Barbosa, CF; Suguio, K. 1999. Biosedimentary facies of a subtropical microtidal estuary; an example from southern Brazil. J. Sediment. Res. 69, 576-587.
- Baumgarten, MGZ; Rocha, JMB; Niencheski, LFH. 1996. Manual de análises em oceanografia química. Rio Grande: Editora da FURG.
- Brasil (Ministério do Meio Ambiente), 2005. Resolução n.357/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Available in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Accessed date: 18 de December 2022.
- Brasil (Ministério do Meio Ambiente), 2011. Resolução n.430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Available in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Accessed date: 18 December 2022.
- Benon, P; Blanc, F; Bourgade, B. 1976. Golfe de Fos: impact de la pollution. Fondation scientifique Ricard, Observatoire de la mer.
- Bergé, A; Wiest, L; Baudot, R; Giroud, B; Vulliet, E, 2018. Occurrence of multi-class surfactants in urban wastewater: contribution of a healthcare facility to the pollution transported into the sewerage system. Environmental Science and Pollution Research, 25, 9219-9229.

- Bonfim, JH; Silva, LGD; Gavazza, S; Florencio, L; Kato, MT. 2016. Remoção de alquilbenzeno linear sulfonato em esgoto doméstico tratado em reator UASB e lagoa de polimento. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 21, 397-406.
- Carballa, M; Omil, F; Lema, JM. 2005. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewageprimary treatment. *Water Res.* 39, 4790–4796.
- Cavalcante, RF; Marinho, GM; Barbosa, BCA, 2014. Impactos Ambientais do Alquilbenzeno Sulfonato Linear/Environmental Impacts of Linear Alkyl Benzene Sulfonate. *HOLOS* 30, 135.
- Clara, M; Scharf, S; Scheffknecht, C; Gans, O. 2007. Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research* 41, 4339-4348.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Água e Saneamento), 2019. Nota técnica sobre os sistemas de esgotamentos sanitários da Região Metropolitana do Recife. Pernambuco: Companhia Pernambucana de Saneamento.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Água e Saneamento), 2020. Mensagem pessoal recebida de <ouvidoriacompesa@compesa.com.br> em 21 out. 2020.
- Costa, BVM; Moreira, MZ; Bastos RF; Yogui, GT. 2021a. Distribution and origin of sedimentary organic matter in an eutrophic estuary: Pina Sound – NE Brazil. *An. Braz. Acad. Sci.* 93, 20190638.
- Costa, BVM; Santos, PJP; Yogui, GT. 2021b. Origin and Distribution of Total Organic Matter and Aliphatic Hydrocarbons in Sedimentary Fractions of a Highly Urbanized, Tropical Estuary. *Estuaries Coast.* 81, 1-12.
- CPRH (Agência Estadual do Meio Ambiente). 2015. Unidades de conservação estaduais de Pernambuco. Recife.
- Dauner, ALL; Martins, CC. 2015. Spatial and temporal distribution of aliphatic hydrocarbons and linear alkylbenzenes in the particulate phase from a subtropical estuary (Guaratuba Bay, SW Atlantic) under seasonal population fluctuation. *Sci. Total Environ.* 536, 750–760.
- Dyer, K.R., 1995. Sediment transport processes in estuaries. In: Perillo, G.M.E. (Ed.), *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Elsevier, New York, 423–449
- Eganhouse, RP; Blumfield, DL; Kaplan, IR. 1983. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 17, 523–530.
- Eichhorn, P; Rodrigues, SV; Baumann, W; Knepper, TP, 2002. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. *Science of the total environment*, 284(1-3), 123-134.
- Fairchild, JF; Dwyer, FJ; La Point, TW; Burch, SA; Ingersoll, CG. 1993. Evaluation of a laboratory-generated NOEC for linear alkylbenzene sulfonate in outdoor experimental streams. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 12, 1763-1775.
- Feitosa, F; Passavante, J. 1991. Distribuição espacial e temporal da biomassa primária do fitoplâncton na bacia do Pina (Recife-Pernambuco–Brasil). *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, 22, 65-82.
- Fernandes, MB; Sicre MA; Cardoso JN; Macêdo SJ. 1999. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 231, 1-16.
- Flemming, BW. 2000. A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis ternary diagrams. *Cont. Shelf Res.* 20, 1125-1137.

- Flores Montes, MDJ; Paulo, JG; Nascimento Filho, GA; Gaspar, FL; Feitosa, FA; Santos Junior, AC; Batista, T NF; Travassos, RK; Pitanga, ME. 2011. The trophic status of an urban estuarine complex in Northeast Brazil. *J. Coast. Res.* 64, 408–411.
- González S, Petrovic M, Barceló D. 2004. Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *J Chromatography A* 1052, 111–120
- Haigh, SD. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Sci. Total Environ.* 185, 161-170.
- HAMPEL, M., J.B. ORTIZ-DELGADO, C. SARASQUETE, AND J. BLASCO. 2008. Effects of sediment sorbed linear alkylbenzene sulphonate on juveniles of the Senegal sole, *Solea senegalensis*: Toxicity and histological indicators. *Histol. Histopathol.* 23, 14.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2021. Demographic Census of Recife city – Pernambuco. Available in: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/panorama>. Accessed date: 20 October 2021.
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), 2020. Normais climatológicos do Brasil (1961 - 1990). Brasília. Accessed date: 22 December 2020.
- Koga, M., Yamamichi, Y.; Nomoto, Y; Irie, M; Tanimura, T; Yoshinaga, T. 1999. Rapid determination of anionic surfactants by improved spectrophotometric method using methylene blue. *Analytical sciences* 15, 563-568.
- Lara-Martín, PA; Corada-Fernández, C; Gómez-Parra, A; González-Mazo, E. 2010. Seasonal changes in the concentration of anionic surfactants in estuarine sediments from the River Guadalete (Cadiz, Spain). *Scientia Marina*, 74(S1), 125-131.
- Larson, RJ; Rothgeb, TM; Shimp, RJ; Ward, TE; Ventullo, RM. 1993. Kinetics and practical significance of biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in the environment. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 645-657.
- Lauenstein, G.G., Cantillo, A.Y., 1998. Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project. 1993–1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA. 130–233.
- Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Núñez-Olea, J., Ríos, F., 2016. Acute toxicity of anionic and non-ionicsurfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 125, 1–8.
- Lemos, RTO; Carvalho, PSM; Zanardi-Lamardo, E. 2014. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Mar. Pollut. Bull.* 82, 183-188.
- León, VM; Gómez-Parra, A; González-Mazo, E. 2004. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2359-2367.
- León, VM; Gómez-Parra, A; Rubio, JÁ; González-Mazo, E. 2011. Sorption of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids on marine sediments. *Repositorio Instituto Espanol de Oceanografia*, Madrid, Spain.
- Maciel, DC; Costa, BVM; Santos, LPS; Souza, JRB; Zanardi-Lamardo, E. 2015a. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkman Rocco (1973). *Trop. Oceanog. (Online)*, 43, 26-37.

- Maciel, DC; Souza, JRB; Taniguchi, S; Bícigo, MC; Zanardi-Lamardo, E. 2015b. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 429-433.
- Maciel, D.C., Souza, J.R.B, Taniguchi, S., Bícigo, M.C., Schettini, C.A.F., Zanardi-Lamardo, E., 2016. Hydrocarbons in sediments along a tropical estuary-shelf transition area: Sources and spatial distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 113, 566-571.
- Maciel, D. C., Castro, Í. B., de Souza, J. R. B., Yogui, G. T., Fillmann, G., & Zanardi-Lamardo, E., 2018. Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 126, 473-478.
- Magam, SM; Zakaria, MP; Halimoon, N; Aris, AZ; Kannan, N; Masood, N; Latif, MT. 2016. Evaluation of distribution and sources of sewage molecular marker (LABs) in selected rivers and estuaries of Peninsular Malaysia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5693-5704.
- Majori, L; Morelli, ML; Rausa, G; Diana, L. 1968. Recherches sur la pollution des eaux de mer dans le Golfe de Trieste. *Rev. Int. Océanogr. Méd.* 9, 83-98.
- Martins, CC; Bícigo, MC; Mahiques, MM; Figueira, RCL; Tessler, MG; Montone, RC. 2010. Depositional history of sedimentar linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). *Environ. Pollut.* 158, 3355-3364.
- Martins, CC; Cabral, AC; Cintra, SCTB; Dauner, ALL; Souza, FM. 2014. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environ. Pollut.* 188, 71–80.
- Medeiros, PM; Bícigo, MC. 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP—Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 761-769.
- Medeiros, PM; Bícigo, MC; Castelão, RM; Del Rosso, C; Fillmann, G; Zamboni, AJ. 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77–87.
- Miranda, L.B; Castro, B.M. de; Kjerfve, B., 2002. *Princípios de oceanografia física de estuários*. EDUSP, São Paulo, v. 1.
- Montuori, P; Triassi, M. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons loads into the Mediterranean Sea: Estimate of Sarno River inputs. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 512-520.
- Morrall, SW; Dunphy, JC; Cano, ML; Evans, A; McAvoy, DC; Price, BP; Eckhoff, WS. 2006. Removal and environmental exposure of alcohol ethoxylates in US sewage treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 3-13.
- Mugray, AK; Kumar, P. 2008. Anionic surfactants in treated sewage and sludges: Risk assessment to aquatic and terrestrial environmental. *Bioresour. Technol.* 99, 2919–2929
- Nascimento, FCR; Muniz, K; Feitosa, FAN; Araújo, JP; Silva, RMS; Silva, GS; Flores-Montes, MJ. 2003. Disponibilidade nutricional da Bacia do Pina e Rio Tejiú (Recife-PE- Brasil) em relação aos nutrientes e biomassa primária (setembro/2000). *Trop. Oceanog.* 31, 149-169.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2002. Dodecylbenzene and undecylbenzene (isomers Benzenes, C10-C16 alkyl derivative). Geneva: UNEP, p.79.

- Oliveira, DD; Souza-Santos, LP; Silva, HKP; Macedo, SJ. 2014. Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 373–378.
- Painter HA; Zabel T, 1989. The behavior of LAS in sewage treatment. *Tenside Surf Det.* 26, 108-115.
- Prats D, López C, Vallejo D, Varó P, León VM. 2006. Effect of temperature on the biodegradation of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) and alcohol ethoxylate (AE). *J. Surfactant Deterg.* 9, 69–75.
- Penteado, JCP; El Seoud, AO; Carvalho, LR, 2006. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Quím. nova*, 29, 1038-1046.
- Pulidindi, K.; Pandey, H., 2017. Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) Market Size By Application (Dish Washing Liquids, Household Detergents & Cleaners, Industrial Cleaners, Personal Care Products), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Spain, Italy, China, India, Japan, Australia, Indonesia, Malaysia, Brazil, Mexico, South Africa, GCC), Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2024. [S.l.]. Available from: <https://www.gminsights.com/industryanalysis/linear-alkylbenzene-sulfonate-LAS-market>. Accessed date: 12 December 2022.
- Quevauviller, PH; Cofino, W; Vijverberg, A; Wells, DE; Griepink, B. 1992. Quality assurance in marine monitoring. *Proceedings of the Workshop Held in Noordwijkerhout*. 21–23, p. 43.
- Régis, CG; Souza-Santos, LP; Yogui, GT; Moraes, AS; Schettini, CAF. 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 45-55.
- Santos, GT; Bezerra-Junior, JL; Costa, KMP; Feitosa, FAN. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplancônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife, PE). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4, 95-109.
- Santiago, MF; Silva-Cunha, MDGGD; Neumann-Leitão, S; Costa, KMPD; Palmeira, GCB; Porto Neto, FDF; Nunes, FS. 2010. Phytoplankton dynamics in a highly eutrophic estuary in tropical Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 58, 189-205.
- Schettini, CA. 2002. Caracterização física do estuário do rio Itajaí-açu, SC. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 7, 123-142.
- Schettini, CAF; Miranda, JBD; Valle-Levinson, A; Truccolo, EC; Domingues, EC, 2016a. The circulation of the lower Capibaribe estuary (Brazil) and its implications for the transport of scalars. *Braz. J. Oceanogr.* 64, 263-276.
- Schettini, CAF, Paiva, BP, Batista, RAL, Oliveira Filho, JC, Truccolo, EC, 2016b. Observation of an estuarine turbidity maximum in the highly impacted Capibaribe estuary, .*Braz. J. Oceanogr.* 64, 185–190.
- Scheibel, J., 2004. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *J. Surfactants Deterg.* 7, 319–328
- Silva, TR; Lopes, SRP; Sporn, G; Knoppers, B. A.; Azevedo, DA, 2013. Evaluation of anthropogenic inputs of hydrocarbons in sediment cores from a tropical Brazilian estuarine system. *Microchem. J.* 109, 178-188p
- Silveira, MAV; Pereira, N; Tommasi, LR. 1982. Resultados preliminares sobre OS teores de detergentes anionicos na baía e estuário de Santos. *Bolm Inst. oceanogr.* 31, 95-99.
- Small, C; Nicholls, RJ, 2003. A global analysis of human settlement in coastal zones. *Journal of coastal research*, 584-599.

- Somerfield, PJ; Fonseca-Genevois, VG; Rodrigues, ACL; Castro, FJV; Santos, GAP. 2003. Factors affecting meiofauna community, structure in the Pina Basin, an a urbanized embayment on the coast of Pernambuco, Brazil. *J.Mar.Biolog.Assoc.U.K.* 83, 1209–1213.
- Strickland, JDH; Parsons, TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2.ed. Ottawa, Bulletin Fisheries Research Board of Canada. 167p.
- Takada, H; Ishiwatari, R. 1990. Biodegradation experiments of linear alkylbenzenes (LABs): isomeric composition of C12 LABs as an Indicator of the degree of LAB degradation in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 24, 86–91.
- Takada, H; Eganhouse, RP. 1998. Molecular markers of anthropogenic waste. In: Meyers, RA (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. John Wiley & Sons, New York, 2883–2940.
- Travassos, PEPF; Macedo, SJ; Koenig, ML, 1991. Aspectos hidrológicos do estuário do rio Capibaribe (Recife-PE- Brasil). *Trabalhos Oceanográficos*, Recife, 22, 9-38.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 1992. Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. In: *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, 20, p.78.
- Venhuis, SH; Mehrvar, M. 2004. Health effects, environmental impacts, and photochemical degradation of selected surfactants in water. *International Journal of photoenergy* 6, 115-125.
- Verge, C; Moreno, A; Bravo, J; Berna, JL. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere* 44, 1749-1757.
- Walter, WG. 1961. Standard methods for the examination of water and wastewater.
- Waters, J; Feijtel, TCJ. 1995. AIS/CESIO – Environmental surfactant monitoring programme: outcome of five national pilot studies on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere* 30, 1939-1956.
- Whelan, MJ; Van Egmond, R; Guymier, I; Lacoursière, JO; Vought, LMB; Finnegan, C; Pearson, JM. 2007. The behaviour of linear alkyl benzene sulphonate under direct discharge conditions in Vientiane, Lao PDR. *Water Research* 41, 4730-4740.
- Xavier, DA; Schettini, CA; França, EJ; Figueira, RC; Barcellos RL. 2017. Determination of geochemical background values on a tropical estuarine system in a densely urban area. Case study: Capibaribe estuary, Northeastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 123, 381-386.

Supplementary Material

Figure SM1

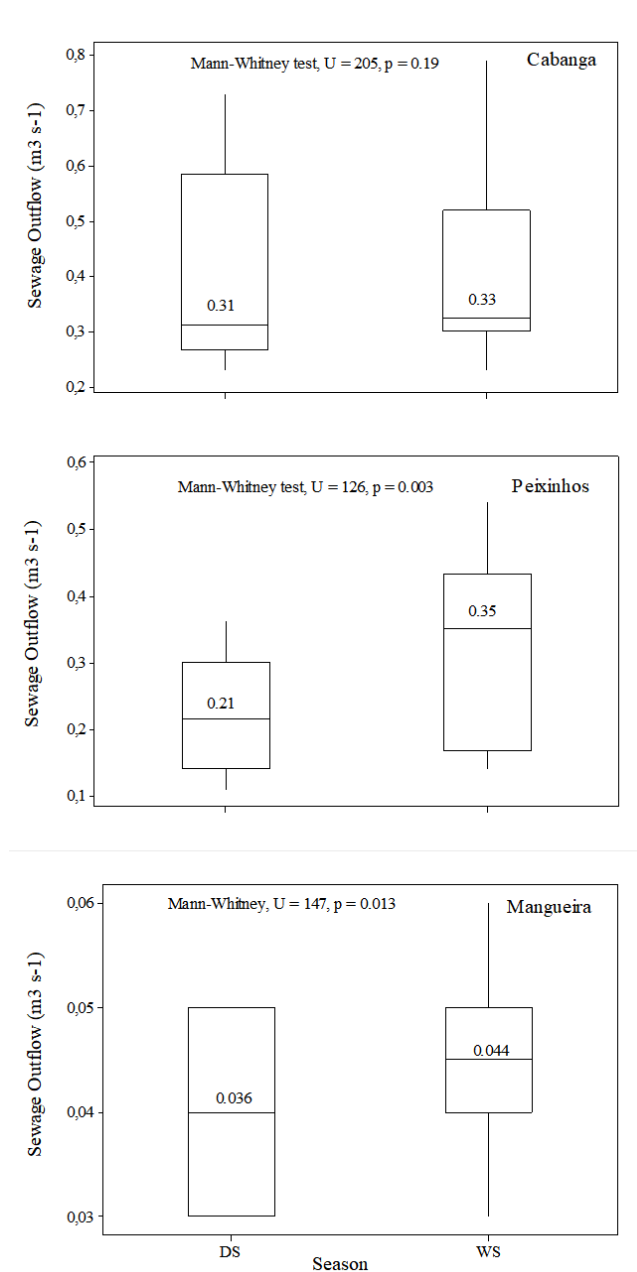


Figure SM1: Sewage outflow from Cabanga, Peixinhos and Mangueira sewage treatment plants between November 2015 and June 2019 during the dry (DS) and wet (WS) seasons. Values inside the boxplots represent the medians.

Figure SM2

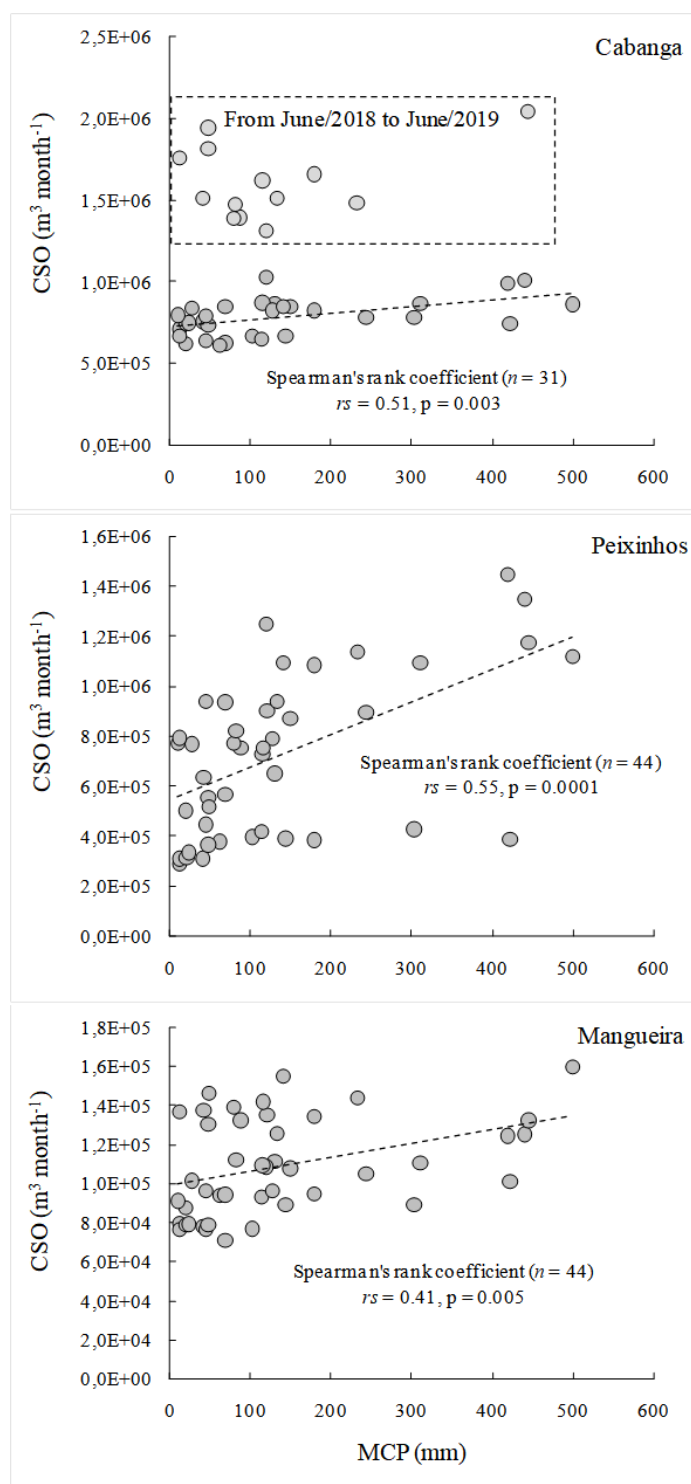


Figure SM2: Cross-plot of monthly cumulative sewage outflow (CSO) from Cabanga, Peixinhos and Mangueira sewage treatment plants versus average monthly cumulative precipitation in the Recife city between November 2015 and June 2019.

Figure SM3

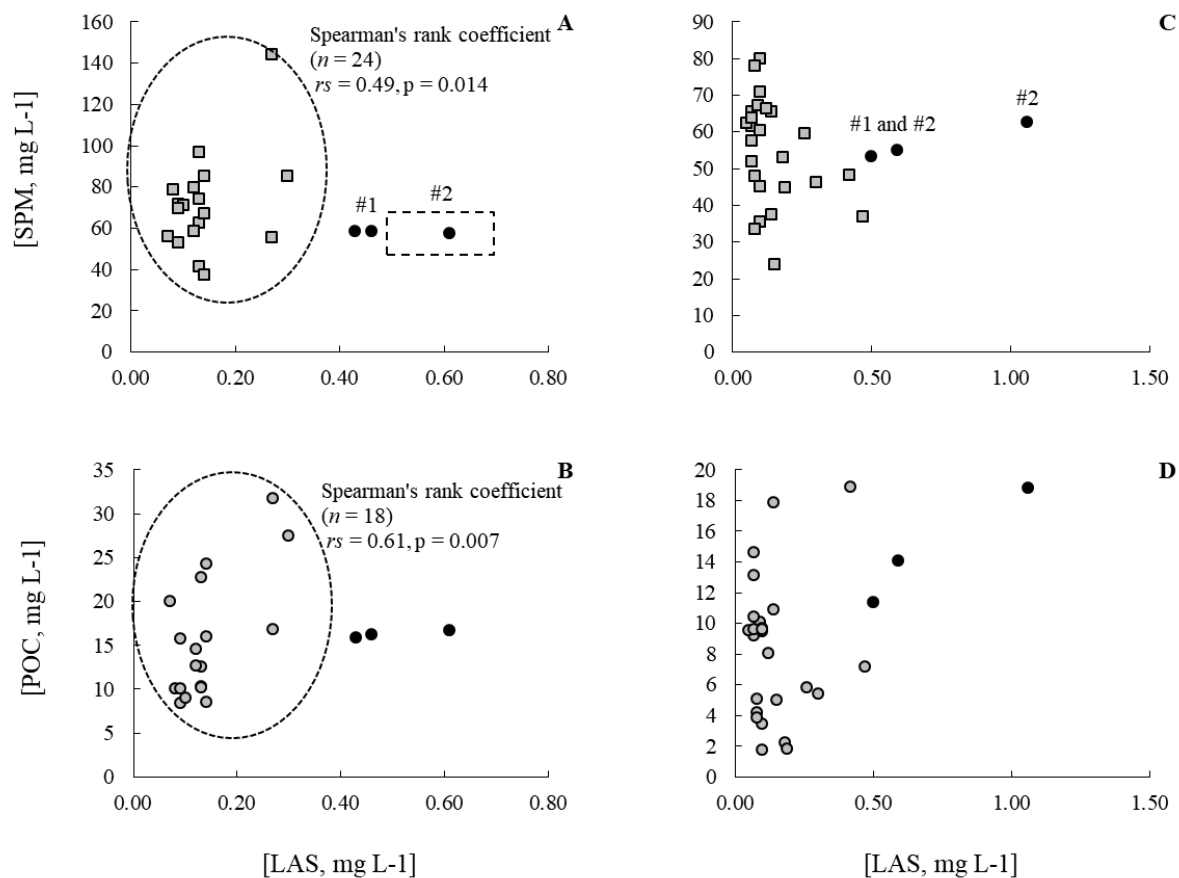


Figure SM3: Cross-plot of suspended particulate matter (SPM, mg L⁻¹) and particulate organic carbon concentrations (POC, mg L⁻¹) versus linear alkylbenzene sulfonates (LAS, mg L⁻¹) during the dry (**A**, **B**) and wet seasons (**C**, **D**).

Table SM1

Table SM1: Linear alkylbenzene homologues concentrations (LAB, ng g⁻¹dw) and diagnostic ratios for sediment samples from Capibaribe Estuarine System, during the wet season.

	Sampling stations						
	1	2	3	4	5	6	7
[LAB, ng g⁻¹dw]							
Σ-C ₁₀	5.5	95	17.5	4.1	18	87.6	82.2
Σ-C ₁₁	23.8	582	112	28.7	116	481	456
Σ-C ₁₂	29.2	873	174	49.9	174	686	597
Σ-C ₁₃	32.5	936	194	63.1	191	753	585
Σ-C ₁₄	0.2	3.4	0.8	0.3	2.4	2.3	1.4
ΣLAB ^a	91.2	2489	498	146	501	2010	1722
I/E ₁₁ ratio	2.0	1.6	1.9	2.2	1.4	1.6	1.9
D ₁₁ (%)	40	32	37	43	27	32	37
I/E ₁₂ ratio	3.1	2.2	2.5	3.0	1.9	2.1	3.4
D ₁₂ (%)	55	43	47	54	38	41	58
I/E ₁₃ ratio	3.0	2.8	3.0	3.6	2.5	2.5	4.9
D ₁₃ (%)	54	51	53	60	47	47	71

^aΣLAB: sum of the 26 LAB congeners ranging from C₁₀ to C₁₄

I/E_n = LAB internal-to-external ratios; n = number of alkyl carbons; D_n = degradation rates of LAB

7 MANUSCRITO 3: EFEITO SUBLETAL E LETAL DO SURFACTANTE DODECILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO LINEAR (C₁₂-LAS) E DO SEU PRECURSOR DODECILBENZENO LINEAR (C₁₂-LAB) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO *DANIO RERIO* UTILIZANDO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

Resumo

Em virtude da sua participação majoritária nas formulações de detergentes e do seu elevado consumo mundial, o surfactante aniônico alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) se tornou um dos principais componentes dos efluentes domésticos juntamente com o seu precursor o alquilbenzeno linear (LAB). A associação entre esses dois compostos ocorre devido a sulfonação incompleta que acontece durante a produção do LAS. O destino final desses contaminantes acaba sendo as estações de tratamento de esgoto (ETEs), os estuários e os rios, despertando assim o interesse de pesquisadores da área ambiental em relação às suas concentrações no ambiente e seus eventuais efeitos deletérios. Diante disso, o presente estudo avaliou a toxicidade letal e subletal do dodecilbenzeno sulfonato de sódio linear (C₁₂-LAS) e do seu precursor dodecilbenzeno linear (C₁₂-LAB), principais representantes do LAS e LAB, respectivamente, para embriões e larvas do peixe *Danio rerio* expostos a concentrações consideradas ambientalmente relevantes (0,5 – 18 mg L⁻¹) em áreas com despejo contínuo de esgotos. Taxas de letalidade, atrasos no desenvolvimento embriolarval, frequência de anormalidades e efeitos comportamentais foram analisados. Foi verificada mortalidade significativa para as larvas expostas ao C₁₂-LAS, apresentando uma concentração letal a 50% dos indivíduos (CL50_{96h}) igual a 11,05 mg L⁻¹. Enquanto que nos ensaios com o C₁₂-LAB obteve-se apenas 10% de mortalidade dos indivíduos após 96 horas. Em relação aos efeitos subletais, ambos compostos apresentam redução significativa no índice de desenvolvimento morfológico (GMS) a partir da concentração de 0,5 mg L⁻¹, quando comparados aos controles. Esse parâmetro mais sensível nas larvas expostas ao C₁₂-LAS. Ambos os compostos causaram anormalidades no desenvolvimento, porém a frequência e a quantidade de anomalias encontradas nos organismos expostos ao C₁₂-LAS foram maiores do que aqueles expostos ao C₁₂-LAB, indicando um maior potencial tóxico do LAS para o *Danio rerio*. Ainda foi possível identificar diferenças patológicas em relação a esses dois contaminantes, enquanto o C₁₂-LAS causou bradicardia e provocou atraso na eclosão das larvas o C₁₂-LAB causou

taquicardia e promoveu a eclosão precoce. Outra diferença observada foi em relação ao efeito comportamental, os indivíduos expostos ao C₁₂-LAS não apresentaram nenhuma alteração no padrão natatório, enquanto que aqueles expostos a determinadas concentrações de C₁₂-LAB exibiram hiperatividade. Diante disso, o presente estudo demonstrou que o uso extensivo de LAS e LAB juntamente ao descarte no ambiente aquático podem afetar seriamente o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos, principalmente nos seus estágios iniciais de vida.

Palavras-chave: Surfactante aniônico, indicadores de esgoto doméstico, dodecilbenzeno, toxicidade, efeitos subletais, letalidade.

Introdução

Nos últimas décadas, a população mundial vem aumentando exponencialmente e, com esse crescimento, há um aumento de substâncias tóxicas presentes no ambiente aquático. A presença difundida desses compostos está relacionada ao seu uso extensivo e a sua incompleta remoção em estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Kasprzyk-Hordern *et al.* 2009; Hawash *et al.*, 2023; Arruda-Santos *et al.*, 2023). Alguns estudos têm revelado que os esgotos podem conter um grupo de poluentes orgânicos emergentes, incluindo Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal (em inglês Pharmaceuticals and Personal Care Products - PPCPs), podendo citar os detergentes, desinfetantes, protetores solar, analgésicos e antibióticos (Niu *et al.*, 2016; Ebele *et al.*, 2017, Hawash *et al.*, 2023).

Os detergentes domésticos estão entre os contaminantes com maior impacto ambiental, pois estima-se que 2 bilhões de quilos por ano são usados em todo o mundo (Sabrino-Figueroa, 2018). O detergente é um composto químico de estrutura complexa que é formado por um surfactante, sendo os alquilbenzenos sulfonatos lineares (LAS) considerados os surfactantes aniônicos líderes no mercado mundial (Perales *et al.*, 1999; Rosety *et al.*, 2001). Esse grupo de compostos é comumente utilizado em produtos de limpeza, numa concentração típica de 1 a 37% (HERA, 2012). Os sabões em pó, por exemplo, contêm entre 3 e 22 % de LAS na composição e os detergentes para lavar louça entre 2 a 30% (HERA, 2012). Os LAS são produzidos a partir da sulfonação dos alquilbenzenos lineares (LABs) que são compostos intermediários na produção dos mesmos. No entanto, durante o processo de sulfonação, 1 a 3% dos LAB não reagem, permanecendo na composição final dos detergentes,

sendo introduzidos juntamente com os LAS nos ambientes aquáticos através de descargas de esgotos domésticos.

Esses compostos apresentam cadeia alquílica contendo normalmente de 10 a 14 átomos de carbono, onde um grupo fenil (LAB) ou sulfofenil (LAS) pode ser anexado em várias posições de isômeros (geralmente entre 2 e 7) (Fountoulakis *et al.* 2009, Gomez *et al.* 2011). Em estudos ambientais é de suma importância associar a presença dos contaminantes com os potenciais efeitos sobre a biota.

Segundo o relatório da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Co-operation and Development – USA) (OECD, 2002), que teve como base os vários testes de toxicidade realizados com peixes, insetos, algas e crustáceos (GLEDHIL *et al.*, 1991), os LABs não apresentam toxicidade significativa para estas espécies na concentração máxima de 1 mg L^{-1} . A exceção foi observada apenas para *Daphnia magna*, que apresentou alterações no crescimento e reprodução a partir da concentração de $0,009 \text{ mg L}^{-1}$ (GLEDHIL *et al.*, 1991). Em contraste, a ação ecotóxica do LAS pode ocorrer a partir da concentração $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ em diferentes níveis tróficos do ambiente aquático (HERA, 2013).

Alguns efeitos nocivos do LAS reportados na literatura são: inibição da atividade de enzimas importantes como esterases e fosfatases (Nkpondion *et al.*, 2016), modificações nos receptores nervosos de peixes que provocam distúrbios na alimentação e termorregulação (Bardach *et al.*, 1965), efeito inibitório significativo no sucesso da fertilização (Rosety *et al.*, 2001; 2003), alterações na permeabilidade das membranas celulares, bem como inibição e modificações no tecido epitelial das brânquias (Bao-Quey; Dar-Yi, 1994; Venhuis; Mehrvar, 2004). Além disso, os surfactantes aniônicos induzem reações inflamatórias e estresse oxidativo (Susmi *et al.*, 2010; Mustapha; Bawa-Allah, 2020) e concentrações elevadas desses contaminantes produzem lise celular e causam a morte de organismos sensíveis (Sandbacka *et al.*, 2000).

Apesar do atual conjunto de dados que se tem a respeito dos efeitos deletérios dos LAS e LABs nos organismos aquáticos, os efeitos em peixes têm sido estudados principalmente em juvenis e adultos (Ribelles *et al.*, 1995a;b; Rosety *et al.*, 1997, 2000; OECD, 2002; Mustapha; Bawa-Allah, 2020), enquanto que os estágios iniciais de desenvolvimento têm recebido pouca atenção (Vaughan; Van Egmond; 2010; Wang *et al.*, 2015). As fases iniciais de vida dos peixes são mais sensíveis aos contaminantes químicos (Di Giulio; Hinton, 2008), o que fez com que os testes utilizando as fases embriolares do *Danio rerio* se tornassem um importante modelo biológico para avaliação de toxicidade de efluentes,

de moléculas específicas isoladas, ou de misturas ambientais complexas em estudos de monitoramento ambiental (Embry *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2021). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do dodecilbenzeno sulfonato de sódio linear (C₁₂-LAS) e do dodecilbenzeno linear (C₁₂-LAB) para as fases embriolarvais do *Danio rerio* considerando biomarcadores morfológicos e comportamentais expostos às concentrações que podem ser ambientalmente relevantes para áreas onde há lançamento de esgoto bruto (0,5 – 18 mg L⁻¹).

Materiais e Métodos

Cultivo dos organismos

Os reprodutores do *D. rerio* foram cultivadas no Laboratório de Ecotoxicologia aquática da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram mantidos em aquários de 100 L e alimentados quatro vezes ao dia com ração 40% de proteína de peixe e náuplios recém-eclodidos vivos de *Artemia salina*. A qualidade da água do cultivo foi mantida assegurando-se a concentração de amônia total abaixo de 0,2 mg L⁻¹, pH variando entre 6,5 a 7,5, oxigênio dissolvido 6,0 ± 0,4 mg L⁻¹ (média ± desvio padrão) e temperatura 28 ± 0,5 °C (média ± desvio padrão).

Os ovos fertilizados foram obtidos do plantel com proporção de uma fêmea madura para três machos, que foram separados na tarde anterior ao experimento em um aquário de 15 L. Após a desova e fertilização ao amanhecer, foi realizada uma triagem e a seleção dos ovos fertilizados foi feita através da observação direta em um estereomicroscópio Zeiss® com 50 X de magnificação. A taxa de fertilização foi superior a 90% e os ovos foram utilizados com até 4 horas pós-fertilização (hpf).

Preparo das soluções

A solução estoque do C₁₂-LAS (pureza > 80%) foi preparada em água ultrapura na concentração de 100 mg L⁻¹. Posteriormente, foram feitas oito diluições em água de cultivo, obtendo-se para os tratamentos as concentrações: 0,5 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹, 5,0 mg L⁻¹, 7,5 mg L⁻¹, 10,0 mg L⁻¹, 12,5 mg L⁻¹, 15,0 mg L⁻¹ e 18 mg L⁻¹. Em relação aos LABs foi preparada uma solução estoque do C₁₂-LAB (pureza > 99%) (200 mg L⁻¹), em dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como co-solvente, por este ser um composto pouco solúvel em água (DETEN QUÍMICA S.A., 2013). Em seguida, foram preparadas em água de cultivo as concentrações

para os tratamentos de exposição: 0,5mg L⁻¹, 5,0 mg L⁻¹, 7,5 mg L⁻¹, 10,0 mg L⁻¹, 12,5 mg L⁻¹, 15,0 mg L⁻¹ e 18mg L⁻¹. As concentrações escolhidas nesse estudo foram baseadas na faixa das concentrações de LAS que podem ser encontradas em águas superficiais que recebem diariamente esgotos sem tratamento prévio (0,5 – 18 mg L⁻¹).

Exposição dos embriões

Cada tratamento envolveu a exposição de 20 indivíduos em placas de cultivo de células de 24 poços, sendo quatro indivíduos mantidos como controles internos, conforme o método previsto na OECD 236 (OECD, 2013). Para cada teste de LAS e LAB, duas placas de controle com 24 embriões cada foram analisados e comparados com placas dos tratamentos, a exposição ao LAB ainda envolveu um controle de solvente (9 g L⁻¹ DMSO). O volume da solução de exposição em cada poço de cada tratamento foi de 2,5 mL, sendo 2 mL das soluções substituídas a cada 24 horas. Durante os experimentos, as soluções preparadas em água de cultivo foram refrigeradas em frascos âmbar de 250 ml fechadas com tampas herméticas à prova de vazamentos. Cerca de 2 horas antes da renovação das soluções nos poços, estas eram retiradas da geleadeira para permitir que chegasse à temperatura ambiente, igual as registradas nas placas experimentais.

Avaliação das concentrações reais no poço de exposição

As soluções de LAS e LAB foram analisadas no início dos testes de toxicidade para confirmar as concentrações preparadas e até o sexto dia do experimento, sempre antes da troca das soluções para garantir a concentração inicial de exposição durante todo o teste. A determinação desses compostos foi feita através de um espectrofluorímetro (Spectramax M3; Molecular Devices), usando um comprimento de onda de 250 nm para excitação e 295 nm para a medida de emissão, no caso do LAS e de 250 nm para excitação e 590 nm para emissão do LAB (adaptado de Apha, 1998). Os valores foram aferidos com base em curvas de calibração ($r^2 > 0,99$) preparadas para ambos os compostos com C₁₂-LAS e C₁₂-LAB, numa faixa entre 0,3 a 20 mg L⁻¹.

Taxa de letalidade

A letalidade durante o desenvolvimento embriolarval entre 0 e 96 horas pós-fertilização (hpf) foi quantificada seguindo os critérios estabelecidos pela OECD 236 (OECD, 2013) para caracterizar as larvas e os embriões como mortos: coagulação do ovo, ausência de somitos em 24 hpf, ausência do destacamento caudal em 48 hpf e ausência de batimentos cardíacos a partir de 48 hpf.

Índice de desenvolvimento morfológico

O índice de desenvolvimento morfológico, GMS (*General Morphology Score*), se baseia na atribuição de pontos a estruturas consideradas fundamentais ao embrião/larva observada entre 24 e 96 hpf (Beekhuijzen *et al.*, 2015). Dessa forma, cada embrião/larva dos controles e de cada tratamento recebem pontos para cada marco do desenvolvimento alcançado, no qual estão inclusos: o destacamento da cauda, ausência de somitos, desenvolvimento dos olhos e pigmentação, presença de movimento do embrião/larva, presença de circulação sanguínea e batimentos cardíacos, pigmentação da cabeça, corpo e cauda, presença de nadadeiras peitorais, eclosão, presença de uma boca protusível e consumo das reservas do saco vitelínico. Neste estudo, o marco morfológico insuflamento da bexiga natatória não previsto por Beekhuijzen *et al.* (2015) também foi avaliado em 96 hpf, sendo assim o valor máximo do GMS para uma larva perfeita igual a 18 pontos. A redução dos valores do GMS indica atrasos no desenvolvimento embriolarval.

Frequência de anormalidades

A presença de patologias ou anomalias morfológicas durante o estágio inicial de desenvolvimento foram observadas e registradas a cada 24 horas para cada embrião durante os experimentos, e suas frequências foram calculadas após 96 horas de exposição, dividindo o número total de larvas vivas com a presença de anormalidades pelo número total de larvas vivas em cada tratamento. Essas anormalidades incluíam circulação lenta ou ausente (24 hpf), ausência de movimentos (24 hpf), eclosão prematura (48 hpf), atraso na eclosão (72 hpf), atraso no desenvolvimento da boca (72 e 96 hpf), ausência de pigmentação (72 hpf), malformação da notocorda (96 hpf), absorção incompleta do saco vitelínico e ausência de insuflação da bexiga natatória (96 hpf).

Frequência de contrações ventriculares

A frequência cardíaca foi quantificada nas larvas em 48 e 72 hpf, período em que um organismo saudável apresenta a formação completa do coração, possibilitando a observação dos batimentos cardíacos. As observações são realizadas com o auxílio de um microscópio invertido DIGILAB®, utilizando um aumento de 20 vezes. A quantificação foi feita pela contagem do número de contrações ventriculares em um período de 30 segundos utilizando um cronômetro, em um total de 10 indivíduos para cada tratamento. A frequência cardíaca foi expressa em contrações ventriculares por segundo.

Velocidade natatória espontânea média

Os indivíduos sobreviventes em 168 hpf de cada tratamento foram transferidos individualmente para placas de cultivo de células de 12 poços com 3 mL de água limpa. Cada larva foi filmada durante 5 minutos (300 segundos) em visão superior, usando câmeras de vídeo (modelo VP600H, Intellbras®, São José, Brasil) com lentes de zoom variável de 6-60 mm, sendo 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).

Análises estatísticas

O cálculo da concentração letal para 50% dos organismos expostos em um período de 96 h ($\text{CL}_{50_{96\text{h}}}$) foi feita por um modelo logístico presente no pacote drc (Ritz *et al.*, 2016) através do software R 4.0.2 (R CoreTeam, Áustria). A análise comparativa entre os grupos controles e os tratamentos com C_{12} -LAS e C_{12} -LAB, em relação ao índice GMS, frequência cardíaca e os parâmetros comportamentais natatórios foram feitas através do teste de variância (ANOVA) um fator. Quando os testes de normalidade e homocedasticidade foram aceitos, os dados foram submetidos a uma ANOVA paramétrica seguida do teste de Dunnett para avaliar as diferenças apresentadas entre o controle e os demais tratamentos. Quando não foi observado normalidade e homocedasticidade nos dados, foi aplicado o teste de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para detectar essas diferenças em comparação com ao controle. A normalidade foi verificada por teste de Shapiro-wilk e homocedasticidade pelo teste da mediana de Levene. Todas essas análises foram realizadas no

software SigmaPlot 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha). As diferenças estatísticas nas frequências de anormalidades foram avaliadas através do teste-t para proporções utilizando o software Statistic Calculator (StatPac, Northfield, USA).

Resultados

Taxa de letalidade

O LAS foi letal em 72 hpf para 100% dos organismos no tratamento de 18 mg L⁻¹. No final das 96 hpf o único tratamento que não induziu mortalidade foi o de 0,5 mg L⁻¹, enquanto que os demais apresentaram mortalidade menor que 30%, com exceção dos tratamentos de 12,5 e 15 mg L⁻¹, que tiveram uma taxa de mortalidade igual a 75% e 95%, respectivamente. A CL50_{96h} foi igual a 11,05 ± 0,34 mg L⁻¹ de C₁₂-LAS (Figura 1). Nos ensaios realizados com o C₁₂-LAB não foi possível calcular a concentração letal para 50% dos indivíduos ao final das 96 horas (CL50-96h), pelo fato da maior taxa de mortalidade registrada ao final das 96 hpf ter sido igual a 10% na concentração de 10 mg L⁻¹.

Tabela 1. Taxa de mortalidade (%) acumulada dos embriões e larvas de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de C₁₂-LAS e C₁₂-LAB (mg L⁻¹) após 96 hpf. : Controle e C.S : Controle do solvente.

Composto	Concentrações (mg L ⁻¹)	24hpf	48hpf	72 hpf	96 hpf
C ₁₂ -LAS	C	5%	5%	5%	5%
	0,5	0%	0%	0%	0%
	2,5	5%	5%	5%	5%
	5,0	5%	5%	5%	5%
	7,5	5%	5%	20%	20%
	10,0	10%	10%	20%	25%
	12,5	5%	5%	20%	75%
	15,0	10%	15%	85%	95%
	18,0	80%	95%	100%	-
C ₁₂ -LAB	C	0%	0%	0%	0%
	CS	0%	0%	0%	0%
	0,5	0%	0%	0%	0%
	5,0	5%	5%	5%	5%
	7,5	0%	0%	0%	5%
	10,0	5%	5%	5%	10%
	12,5	0%	0%	0%	0%
	15,0	0%	0%	0%	0%
	18,0	5%	5%	5%	5%

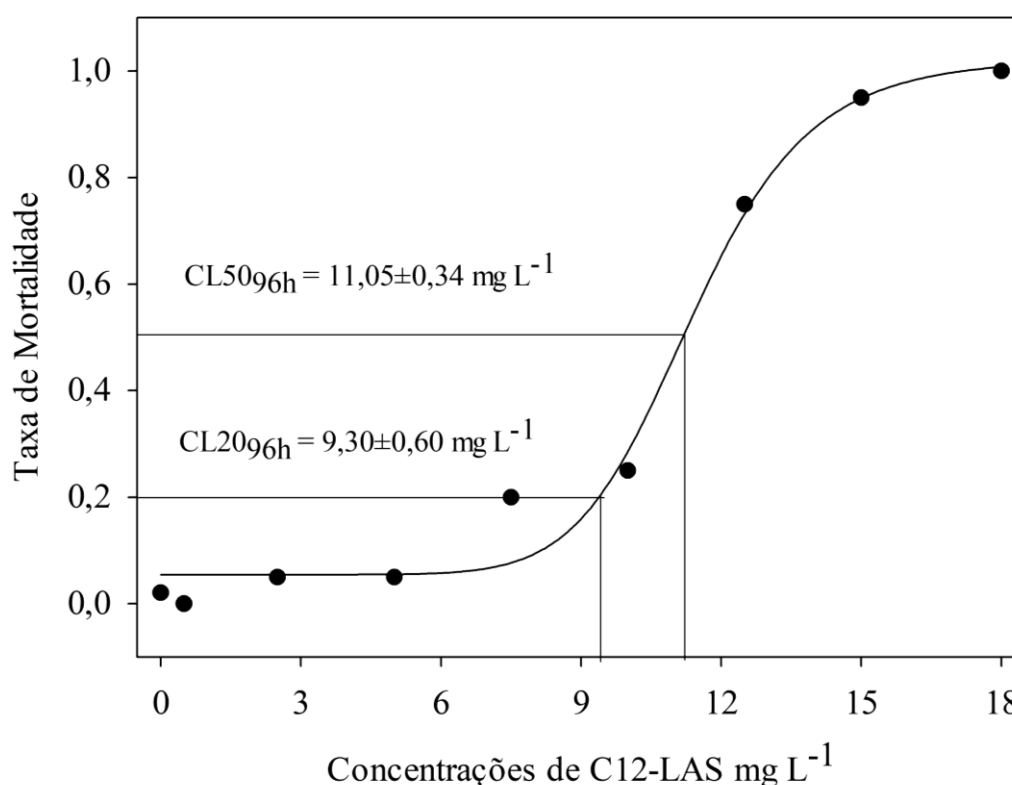


Figura 1. Taxa de mortalidade para a fase embriolarval de *Danio rerio* exposto por 96 hpf a diferentes concentrações de C₁₂-LAS. CL20 ($9,30 \pm 0,60 \text{ mg L}^{-1}$) e CL50 ($11,05 \pm 0,34 \text{ mg L}^{-1}$) calculada por ajuste dos dados segundo o modelo logístico. n = 20 embriões expostos em cada tratamento.

Índice de desenvolvimento morfológico

Foram detectadas reduções significativas no GMS em todos os tratamentos a partir da concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de C₁₂-LAS quando comparados com o controle, indicando um atraso concentração dependente no desenvolvimento embriolarval de *D. rerio* (Figura 2A). Os marcos morfológicos que mais influenciaram na redução do índice GMS durante o processo embrionário foram: circulação lenta ou ausente, movimento ausente, atraso na eclosão, atraso no desenvolvimento da boca, baixa pigmentação cabeça, corpo e cauda, vitelo não absorvido e bexiga não insuflada.

Em relação ao LAB, também foram observadas reduções estatísticas no GMS em todos os tratamentos a partir da concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de C₁₂-LAB, quando comparadas ao controle (Figura 2B). Os marcos morfológicos não desenvolvidos durante o processo embrionário quando expostos ao C₁₂-LAB foram: circulação ausente, eclosão prematura e o não insuflamento da bexiga.

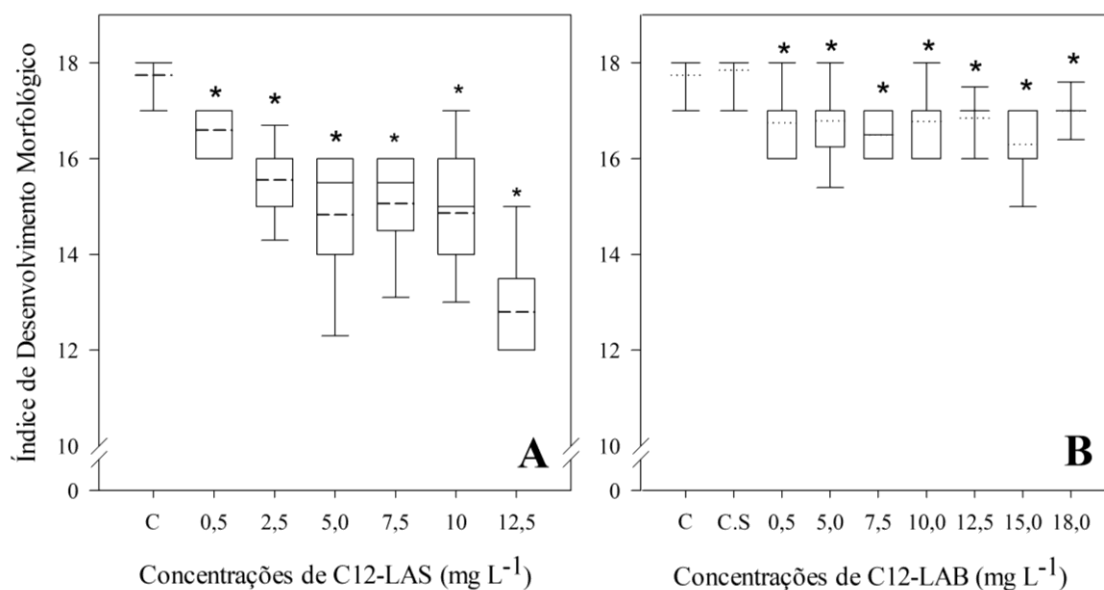


Figura 2. (A) Índice de desenvolvimento morfológico “GMS” da fase embriolarval de *Danio rerio* exposta por 96 h a concentrações crescentes de C₁₂-LAS (Kruskal-Wallis H=101,41, $p < 0,001$, Dunn, $p < 0,05$) **(B)** GMS da fase embriolarval de *Danio rerio* exposta por um período de 0 a 96 h em concentrações crescentes de C₁₂-LAB (Kruskal-Wallis H=94,58 $p < 0,001$, Dunn $p < 0,05$). As linhas horizontais tracejadas do box plot indicam valores médios e as linhas horizontais contínuas do box plot (inferior, médio e superior) indicam quartis de 25, 50 (mediana) e 75%, respectivamente. (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. C: Controle e C.S : Controle do solvente. n = 20 embriões expostos em cada tratamento.

Desenvolvimento de anormalidades

As principais anormalidades vistas durante a fase embriolarval de desenvolvimento nos testes com LAS foram: problemas circulatórios (máxima de 50%) e ausência de movimentos (máxima de 75%) em 24 hpf, atraso na eclosão em 72 hpf (máxima de 100%), atraso no desenvolvimento da boca (máxima de 45%) em 72-96hpf, presença de edemas (máxima de 62%) em 24-96 hpf, alterações na curvatura da notocorda do tipo cifose (máxima de 40%), baixa pigmentação (máxima de 100%), absorção incompleta do saco vitelínico (máxima de 89%) e bexiga não insuflada (máxima de 100%) em 96 hpf (Tabela 2). O não insuflamento da bexiga natatória foi a anomalia mais expressiva durante os ensaios com o C₁₂-LAS, sendo observado em 100% das larvas em todas as concentrações testadas.

Para o LAB a frequência de anormalidades nas larvas expostas aos tratamentos foram maiores para ausência de circulação em 24 hpf (máxima de 60%), eclosão precoce em 48 hpf (máxima de 25%), baixa pigmentação (máxima 84%) e ausência de insuflamento da bexiga natatória (máxima de 100%), sendo esta última a principal anomalia observada nas larvas expostas a todas as concentrações utilizadas nos ensaios (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência (%) de anormalidades registradas durante o desenvolvimento embriolarval de *Danio rerio* após 96h de exposição a diferentes concentrações de C₁₂-LAS (mg L⁻¹).

Patologias	Concentrações de C ₁₂ -LAS em mg L ⁻¹							
	C	0,5	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
Circulação lenta ou ausente 24hpf	10%	40%	30%	40%	40%	50%*	40%	45%*
Ausência de movimento 24hpf	0%	35%*	65%*	75%*	75%*	70%*	50%*	60%*
Eclosão prematura 48hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Atraso na eclosão 72hpf	8%	20%	50%*	40%*	40%*	50%*	75%*	100%*
Atraso no desenvolvimento da boca 72-96hpf	10%	0%	25%	25%	25%	25%	45%*	15%
Edemas 24-96hpf	0%	20%	26%	16%	13%	33%*	62%*	46%*
Escoliose 24-96hpf	0%	0%	5%	0%	6%	0%	0%	0%
Lordose 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%*
Cifose 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	6%	0%	40%*	0%
Baixa pigmentação 96hpf	16%	25%	44%*	44%*	87%*	100%*	100%*	100%*
Vitelo não absorvido 96hpf	0%	31%*	13%	31%*	25%*	50%*	89%*	23%*
Bexiga natatória não insuflada 96hpf	4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

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

Tabela 3: Frequência (%) de anormalidades registradas durante o desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* após 96h de exposição a diferentes concentrações de C₁₂-LAB (mg L⁻¹).

Patologias	Concentrações de C ₁₂ -LAB em mg L ⁻¹								
	C	CS	0,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	18,0
Circulação lenta ou ausente 24hpf	6%	4%	10%	15%	35%*	35%*	60%*	55%*	45%*
Ausência de movimento 24hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	15%	0%
Eclosão prematura 48hpf	0%	4%	25%*	15%	20%*	15%	5%	20%*	25%*
Atraso na eclosão 72hpf	0%	0%	20%*	5%	0%	0%	0%	5%	5%
Atraso no desenvolvimento da boca 72-96hpf	0%	0%	5%	0%	0%	0%	0%	5%	20%*
Edemas 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Escoliose 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Lordose 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Cifose 24-96hpf	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Baixa pigmentação 96hpf	0%	0%	0%	11%	10%	28%*	20%*	50%*	84%*
Vitelo não absorvido 96hpf	0%	0%	5%	0%	5%	22%*	0%	20%*	0%
Bexiga natatória não insuflada 96hpf	4%	8%	100%*	100%*	95%*	100%*	100%*	100%*	100%*

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

Frequência de contrações ventriculares

A frequência cardíaca em 48 hpf reduziu estatisticamente a partir do tratamento de 2,5 mg L⁻¹ (Figura 3A). Em 72 hpf essa redução estatística permaneceu, porém isto foi observado a partir de uma concentração maior (5 mg L⁻¹) (Figura 3C). Enquanto que para o LAB, as larvas expostas aos tratamentos nas 48 e 72 hpf apresentaram uma tendência de aumento a partir da concentração de 10 e 7,5 mg L⁻¹, respectivamente, em relação ao controle (Figura 3B, D).

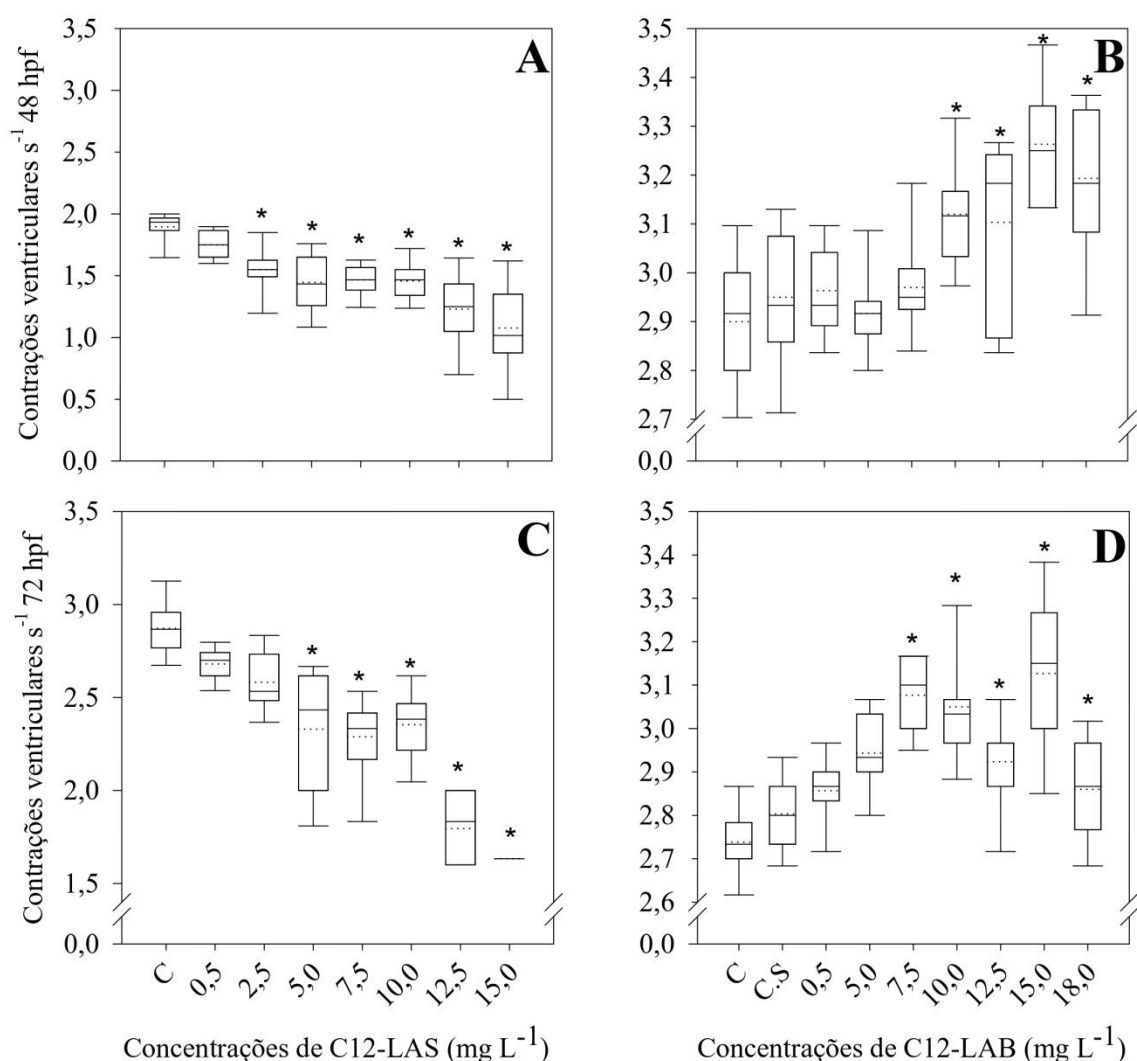


Figura 3. Frequência de contrações ventriculares quantificadas em larvas de *Danio rerio* (n=10) expostas a concentrações crescentes de C₁₂-LAS e C₁₂-LAB. **(A)** Frequência cardíaca das larvas em 48 hpf expostas ao C₁₂-LAS (Kruskal-Willis H= 63,018 p < 0,001, Dunn p < 0,05) **(B)** Frequência cardíaca das larvas em 48 hpf expostas ao C₁₂-LAB (ANOVA F = 11,957 p < 0,001, Dunnett p < 0,05) **(C)** Frequência cardíaca das larvas em 72 hpf expostas ao C₁₂-LAS (Kruskal-Willis H= 61,082 p < 0,001, Dunn p < 0,05) **(D)** Frequência cardíaca das larvas em 72 hpf expostas ao C₁₂-LAB (ANOVA F = 14,566 p < 0,001, Dunnett p < 0,05). (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (C). CS: Controle do solvente.

Efeitos Comportamentais

Velocidade natatória espontânea média

As larvas sobreviventes expostas aos tratamentos com LAS não apresentaram diferença estatística no parâmetro velocidade média (Figura 4A). Enquanto que as larvas expostas aos tratamentos 10 e 15 mg L⁻¹ com LAB, apresentaram um aumento significativo deste parâmetro em relação às larvas controle (Figura 4B).

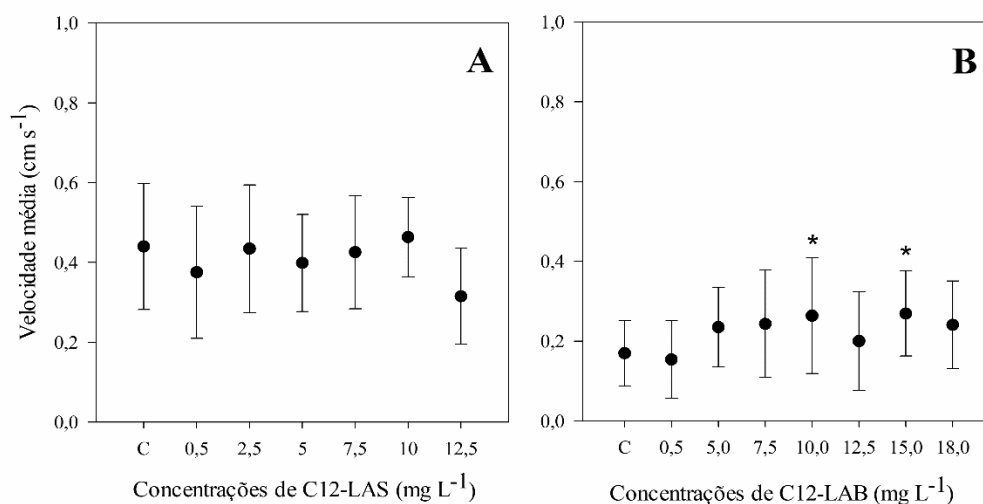


Figura 4. (A) Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de *Danio rerio* 168 hpf expostos a concentrações crescentes de C₁₂-LAS. (ANOVA $F = 0,745$ $p < 0,05$) **(B)** Velocidade natatória espontânea média em 30 intervalos de 10s de *Danio rerio* 168 hpf expostos a concentrações crescentes de C₁₂-LAB (ANOVA $F = 3,285$ $p < 0,001$, Dunnett $p < 0,05$) (*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao Controle (C).

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que tanto o surfactante (C₁₂-LAS) como o seu precursor (C₁₂-LAB) são tóxicos para os embriões de *D. rerio*, ocasionando efeitos letais e/ou subletais nesses organismos. A letalidade foi observada principalmente nos indivíduos expostos ao C₁₂-LAS (Tabela 1), composto já considerado letal para uma ampla variedade de organismos como: Crustáceos [(*Daphnia Magna*: CL₅₀_{96h} = 8,1 mg L⁻¹; Verge et al., 2001); *Hyaella azteca* (CL₅₀_{96h} = 3,1 mg L⁻¹; Versteeg; Rawlings, 2003)], Moluscos [(*Corbicula fluminea* (CL₅₀_{96h} = 3,0 mg L⁻¹; Versteeg; Rawlings, 2003); *Elimia sp.* (CL₅₀_{96h} = 3,0 mg L⁻¹; Versteeg; Rawlings, 2003)] e peixes [(*Pimephales promelas* (CL₅₀_{96h} = 1,7 mg L⁻¹; Versteeg; Rawlings, 2003); *Ictalurus punctatus* (CL₅₀_{96h} = 1,7 mg L⁻¹; Versteeg; Rawlings, 2003)].

A CL₅₀_{96h} estimada neste estudo para o estágio embriolarval de *D. rerio* foi igual a 11,05 mg L⁻¹ de C₁₂-LAS, sendo este valor semelhante à CL₅₀_{96h} estimada para juvenis do peixe *Oreochromis niloticus* (10 mg L⁻¹, Gouda et al., 2022) e para a espécie de peixe *Oryzias latipes* (13 mg L⁻¹, Van de Plassche et al., 1999). Nestes estudos os organismos foram expostos a misturas de LAS (C₁₀-C₁₄), incluindo o C₁₂-LAS. Cabe salientar que são esperadas variabilidade nos resultados em testes que utilizam compostos individuais e/ou misturas, uma vez que cada homólogo do LAS possui características particulares (Rand, 1995). É importante notar que, neste estudo, observou-se um rápido aumento das taxas de mortalidade a partir de

8,4 mg C₁₂-LAS L⁻¹, atingindo valores acima de 70% em 12,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ (Figura 1). Isto pode ser considerado um fator preocupante do ponto de vista ambiental, principalmente em ambientes costeiros urbanizados, como o estuário de Cananéia (São Paulo - Brasil), onde foi reportada uma concentração em torno de 8,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ em uma área com influência direta da pluma de esgoto (Aidar *et al.*, 1997).

Além da alta letalidade relatada nas maiores concentrações durante o período de exposição embrionária do *D. rerio* ao C₁₂-LAS, também foram observados efeitos subletais nos indivíduos desde a menor concentração (0,5 mg L⁻¹), como o decréscimo dose-dependente do índice de desenvolvimento morfológico (GMS). Dentre as principais anomalias está a falha na circulação, que foi observada a partir da primeira concentração de exposição (0,5 mg L⁻¹) onde 40% dos indivíduos apresentaram circulação lenta ou ausente. A circulação sanguínea é a responsável pelo transporte de oxigênio (O₂) pelos tecidos, sendo este importante no funcionamento e desenvolvimento de órgãos como o fígado e pâncreas, assim como no insuflamento adequado da bexiga natatória (Korzh *et al.*, 2008; Winata *et al.*, 2010). Dessa forma, problemas circulatórios podem gerar uma série de complicações durante a etapa da organogênese, influenciando, por exemplo, na absorção do vitelo que é a principal fonte de energia desses indivíduos, e cuja demanda é significativa para a formação dos órgãos (Hilton *et al.*, 2008). A ausência de circulação sanguínea em indivíduos de *D. rerio* também foi correlacionada a exposição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (McIntyre *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2021) e à amônia (Alves *et al.*, 2021). No estudo de Alves *et al.* (2021), destaca-se a interferência de outros contaminantes não analisados nas amostras de água superficiais em que os embriões foram expostos que poderiam estar contribuindo com alterações na circulação, como por exemplo o próprio LAS, que foi registrado em concentrações variando de 0,05 a 1,53 mg L⁻¹ em estações dentro do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (Pernambuco - Brasil) (Arruda-Santos *et al.*, Manuscrito 2).

A baixa pigmentação do olho, corpo e cauda foi relatada nos indivíduos de forma dose-dependente no presente estudo, sendo esta encontrada em 100% das larvas a partir da concentração de 7,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ (Tabela 2). O marco morfológico pigmentação é extremamente relevante, pois pode intervir em hábitos e estratégias de sobrevivência desses organismos, como a camuflagem no ambiente (Correia *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados em estágios embrionários de *D. rerio* após exposição aguda a uma mistura de herbicidas (Marson *et al.*, 2013) e fármacos (paracetamol) (Cedron *et al.*, 2020) constatando despigmentação e bloqueio na síntese de melanina.

O atraso na eclosão nas 72 hpf foi observado em 20% dos indivíduos em 0,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹, e em 100% nos indivíduos expostos a concentração de 15 mg C₁₂-LAS L⁻¹, sendo este considerado dose-dependente (Tabela 2). Estudos relatam que esse tipo de anormalidade também vem sendo encontrado em estágios embriolarvais de *D. rerio* exposta metais pesados como o cobre (Muller *et al.*, 2015) e em pesticidas (Yang *et al.*, 2016). A eclosão do embrião acontece devido a combinação de três mecanismos: bioquímico, osmótico e biofísico (Hagenmaier, 1974). Diante disso, o LAS assim como os demais compostos citados acima, possivelmente interferem em algum desses mecanismos resultando no atraso na eclosão.

Outro marco morfológico observado neste estudo, foi ausência de absorção completa ou parcial do vitelo a partir da menor concentração (0,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹) (Tabela 2). Tal anormalidade também foi observada em larvas de *D. rerio* expostas à águas superficiais da Bacia do Rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil), sendo esta associada a presença de HPA e amônia, mas que pode estar sendo influenciada por outros contaminantes não medidos neste estudo (Alves *et al.*, 2021). Como dito anteriormente, a absorção do vitelo no estágio inicial da vida é a fonte de energia para o desenvolvimento de tecidos recém-formados, sendo assim, este deve ser completamente absorvido até as 96 hpf (Kamler, 2008; Beekhuijzen *et al.*, 2015). A incompleta absorção do vitelo pode causar um déficit proteico que pode interferir no comprimento e massa do indivíduo (Kamler, 2008).

O atraso no desenvolvimento mandibular foi observado em 72-96 hpf, no qual apresentou uma frequência de 25% nos organismos expostos à concentração de 2,5 a 10 mg C₁₂-LAS L⁻¹ e 45% e 15% nos indivíduos expostos às concentrações de 12,5 e 15 mg C₁₂-LAS L⁻¹, respectivamente (Tabela 2). Isto pode acarretar problemas na captura de presas, que depende diretamente do desenvolvimento da boca protrusível (Robinson *et al.*, 2019). Além disso, esses organismos precisam ir à superfície capturar uma certa quantidade de ar inicial para que a bexiga natatória seja inflada (Lindsey *et al.*, 2010). Sendo assim, a alta frequência de peixes sem o desenvolvimento adequado da boca nas concentrações testadas neste estudo, também podem ter comprometido o processo de insuflamento da bexiga natatória (Tabela 2). A ausência de bexiga inflada foi encontrada em 100% das larvas expostas desde a menor concentração (0,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹) (Tabela 2), que pode desencadear problemas no crescimento e sobrevivência desses organismos que dificilmente chegam a fase adulta. Resultados semelhantes foram identificados em larvas de *D. rerio* expostas por 96hpf ao escoamento pluvial urbano (McIntyre *et al.*, 2014) e a águas superficiais de rios (Alves *et al.*, 2021) contendo HPA. A ausência deste parâmetro pode interferir na captura de alimento,

influenciar na fuga de predadores e na procura de parceiros, uma vez que a flutuabilidade neutra é essencial para um adequado desempenho natatório (Czesny *et al.*, 2005; Hagenaars *et al.*, 2014).

A presença de edemas perivitelinos e/ou edemas pericárdicos durante o teste foi observada em 20% dos indivíduos na menor concentração de exposição (0,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹), e de até 72% nas larvas expostas a 12,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ (Tabela 2). Esses edemas referem-se a um acúmulo de líquido retido entre os tecidos ou cavidades do corpo, cuja sua presença pode estar associada a algum tipo de inflamação e até mesmo a baixos níveis de O₂ (Incardona *et al.*, 2004). Tal efeito também foi comumente encontrado em larvas de *D. rerio* após exposição ao surfactante catiônico estearamidopropil dimetilamina (SAPDMA) (Al-Jamal *et al.*, 2020), a metais como o cobre e cádmio (Jezierska *et al.*, 2009) e ao HPA (Incardona *et al.*, 2004). A frequência de larvas com patologias na curvatura da notocorda não aumentou de forma dose-dependente, sendo esta pontual em algumas concentrações de exposição ao C₁₂-LAS (Tabela 2). O maior percentual (40%) dessa patologia nas larvas foi a do tipo cifose, observada na concentração de 12,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹. Malformações na curvatura da notocorda é relatada também em larvas expostas a HPAs (Incardona *et al.*, 2004).

Em relação a frequência cardíaca, foi observado uma diminuição significativa nas contrações ventriculares (bradicardia) nas larvas expostas a partir da concentração de 2,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ em 48 hpf e a partir de 5,0 mg C₁₂-LAS L⁻¹ em 72 hpf quando comparados ao controle (Figura 3A, C). Tais reduções na frequência cardíaca também têm sido descrita em larvas de *D. rerio* expostas ao surfactante catiônico SAPDMA (Al-Jamal *et al.*, 2020). Mudanças na frequência cardíaca costumam ser o primeiro sinal fisiológico de toxicidade quando organismos como o *D. rerio* são expostos a determinados tipos de contaminantes como as dioxinas, bifenilas policloradas (PCB) e os HPA (Incardona e Scholz, 2016). É importante ressaltar que a redução na frequência cardíaca pode ter influenciado, também, nos problemas circulatórios encontrados (Tabela 2), e consequentemente influenciado na absorção do vitelo que depende do sistema circulatório para sua total absorção (Kamler, 2008).

Dentre as consequências negativas da exposição de organismos aquáticos a contaminantes também estão aqueles relacionados às funções comportamentais como a natação, o forrageio, fuga de predadores, reprodução e interação social (Scott *et al.*, 2003). Neste estudo, as larvas sobreviventes às exposições ao C₁₂-LAS em 168 hpf não apresentaram nenhuma alteração significativa nos padrões natatórios, mais precisamente na velocidade

natatória espontânea média, quando comparadas ao controle (Figura 4A). Ao contrário do que foi observado para outras espécies de peixes como a tainha (*Mugil platanus*) expostos a concentrações de 1 a 5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ (Barbieri, 2005) e a carpa (*Cyprinus carpio*) expostos a concentrações de 0,5 a 2,5 mg C₁₂-LAS L⁻¹ (Barbieri *et al.*, 2000) que apresentaram diminuição na capacidade de natação. O resultado do presente estudo diferiu daqueles reportados para larvas de *D. rerio* expostas ao surfactante catiônico SAPDMA (Al-Jamal *et al.*, 2020) e ao surfactante não iônico éter aquílico de polioxietileno (AEO) (Wang *et al.*, 2015), que apresentaram reduções locomotoras/comportamentais significativas (hipoatividade) em relação ao controle.

Ao contrário do que foi visto nos testes com LAS, os ensaios realizados com o C₁₂-LAB não apresentaram dados suficientes de letalidade em 96hpf. No entanto, os parâmetros subletais evidenciaram que esse composto também apresenta efeitos tóxicos significativos no período de desenvolvimento avaliado (Figura 2B), porém com menor potencial tóxico do que aqueles observados para o C₁₂-LAS (Figura 2A).

Em relação aos efeitos tóxicos, foi possível observar algumas diferenças entre os dois compostos. Enquanto o C₁₂-LAS promove o atraso na eclosão o C₁₂-LAB induz a eclosão precoce em 48hpf, sendo esta encontrada nos indivíduos em todas as concentrações de exposição (Tabela 3). De acordo com Fuiman (2002), a eclosão antecipada acontece quando há um maior estímulo da enzima corionase que está relacionada à degradação da camada interna do coriön, permitindo a eclosão do indivíduo e o deixando precocemente vulnerável. Dentre os contaminantes que também promovem a eclosão prematura de larvas de *D. rerio* estão o tributilestanho (Liang *et al.*, 2017) e o inseticida bifenthrin (Jin *et al.*, 2009).

Outra diferença relevante é em relação a frequência cardíaca, enquanto o C₁₂-LAS desencadeia a bradicardia nas larvas (Figura 3A,C) o C₁₂-LAB promove taquicardia (frequência cardíaca acelerada) (Figura 3B,D). A avaliação dos indivíduos expostos ao C₁₂-LAB nas 48 e 72hpf, identificou uma tendência de aumento significativo da frequência nas concentrações de 10 mg C₁₂-LAB L⁻¹ e 7,5 mg C₁₂-LAB L⁻¹, respectivamente (Figura 3B,D). Esse mesmo efeito na frequência cardíaca tem sido comumente encontrados em estágios embriolarvais de *D. rerio* expostos a diferentes grupos de compostos como o mercúrio (Samson *et al.*, 2001), cobre (Hallare *et al.*, 2005), HPA (Hallare *et al.*, 2005; Le Bihanic *et al.*, 2015) e os congêneres de éteres difenílicos polibromados (PBDE) (Lema *et al.*, 2007).

Além disso, para o C₁₂-LAB foram observadas alterações no comportamento dos indivíduos com o aumento significativo da velocidade natatória (hiperatividade) nos

tratamentos de 10 e 15 mg C₁₂-LAB L⁻¹ (Figura 4B), ao contrário do LAS que não apresentou nenhum efeito comportamental (Figura 4A). O aumento da velocidade de natação causado pela exposição ao C₁₂-LAB L⁻¹ pode resultar em maior gasto de energia que poderia ser direcionada para o crescimento e/ou outras atividades essenciais, como a reprodução. A hiperatividade natatória também foi encontrada em larvas de *D. rerio* expostas ao surfactante catiônico cloreto de didecildimetilamônio (1227) (Wang *et al.*, 2015).

No Brasil, não há um regulamento estabelecendo os limites seguros de LAS e LAB em efluentes e águas superficiais, porém existe uma legislação que estabelece a concentração total de substâncias tensoativas que reagem com azul de metileno (MBAS), no qual se insere o LAS. A resolução CONAMA, N° 357, de 17 de março de 2005, propõe que para corpos de água doce pertencentes às classes 1 e 2, o valor máximo permitido desses compostos é de 0,5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2005; 2011). Enquanto que para corpos de águas salinas e salobras, o valor máximo permitido é de 0,2 mg/L (BRASIL, 2005; 2011). No entanto, foi visto que a concentração de 0,5 mg L⁻¹ permitida na legislação para o LAS em água doce, tende a causar efeitos subletais significativos no desenvolvimento embrionário do *D. rerio*, cuja etapa é fundamental na vida desses organismos, podendo influenciar negativamente no recrutamento para a fase adulta.

Conclusão

Com base nos parâmetros letais e subletais foi constatado um maior potencial tóxico do LAS comparado ao LAB. A exposição de *D. rerio* na fase embriolarval a C₁₂-LAS em concentrações ambientalmente relevantes pode acarretar retardo no desenvolvimento embriolarval, falhas no sistema circulatório, bradicardia, além de atraso no processo de eclosão e no desenvolvimento da boca, assim como o não insuflamento da bexiga natatória. O C₁₂-LAB age diferente acelerando a eclosão das larvas, promovendo taquicardia nos indivíduos e provocando alterações significativas na natação. Para ambos os compostos, a presença dessas anomalias pode interferir na sobrevivência e/ou no recrutamento desses organismos. Diante disso, este estudo destaca a importância de melhoria e aumento da capacidade do tratamento de esgoto das cidades, para que os impactos decorrentes da presença de LAS e LAB nos efluentes urbanos lançados no corpo receptor sejam amenizados. Além disso, estes resultados podem auxiliar na tomada de decisões pelos órgãos governamentais quanto a revisão dos níveis de tolerância de compostos como o LAS no ambiente e inclusão do LAB na legislação.

Referências

- Al-Jamal, O; Al-Jighefee, H; Younes, N; Abdin, R; Al-Asmakh, MA; Radwan, AB; Nasrallah, GK. 2020. Organ-specific toxicity evaluation of stearamidopropyl dimethylamine (SAPDMA) surfactant using zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* 741, 140450.
- Alves, RN; Mariz Jr, CF; de Melo Alves, MK.; Cavalcanti, MGN; de Melo, TJB; de Arruda-Santos, R. H; Carvalho, PS. 2021. Contamination and toxicity of surface waters along rural and urban regions of the Capibaribe River in tropical northeastern Brazil. *Environ. Toxicol.Chem.* 40, 3063-3077.
- Apha, 1998. American Public Health Association – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, New York, 20 ed.
- Arruda-Santos, RH; Costa, BVM; Carvalho, PSM; Zanardi-Lamardo, E. 2023. Sewage contamination assessment in an urbanized tropical estuary in Northeast Brazil using elemental, isotopic and molecular proxies. *Environ. Pollut.* 317, 120726.
- Bao-Quey, H; Dar-Yi, W. 1994. Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the respiratory functions of Tigerperch (*Terapon Jarbua*). *Zool. Stud.* 33, 205–210.
- Barbieri, E. 2005. Efeito do LAS-C12 (dodecil benzeno sulfonato de sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da tainha (*Mugil platanus*). *Atlântica.* 27, 49-57.
- Barbieri, E; Phan, VN; Gomes, V. 2000. Efeito do LAS-C12, Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear, na taxa metabólica e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicol. Environ. Rest.* 3, 69-75.
- Bardach, JE; Fujiya, M; Holl, A. 1965. Detergent: effect on the chemical senses of the fish *Ictalurus natalis* (Le Suer). *Science* ,148,1605– 1607.
- Beekhuijzen, M; de Koning, C; Flores-Guillén, ME; de Vries-Buitenweg, S; Tobor-Kaplon, M; van de Waart, B; Emmen, H. 2015. 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. *Reprod. Toxicol.* 56, 64-76.
- Brasil (Ministério do Meio Ambiente), 2005. Resolução n.357/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 18 de Dezembro 2022.
- Brasil (Ministério do Meio Ambiente), 2011. Resolução n.430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 18 Dezembro 2022.
- Cedron, VP; Weiner, AM; Vera, M; Sanchez, L. 2020. Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochem. Pharmacol.* 174, 113816.
- Correia, M; Maciel, C; Nascimento, L; Júnior, AM. 2010. Ontogenia da pigmentação das larvas de três espécies de Characiformes, criadas em incubatório. *Enciclopédia biosfera*, v.6.

- Czesny, SJ; Graeb, BD; Dettmers, JM. 2005. Ecological consequences of swim bladder noninflation for larval yellow perch. *Trans. Am Fish Soc.* 134, 1011-1020.
- DETEN QUÍMICA S. A. 2013. Ficha de informações de segurança de produto químico: Linear Alquilbenzeno. Disponível em: http://www.deten.com.br/Files/pdf/produtos/detlab240/FISPQ_LAB_portugues.pdf.
- Di Giulio, RT; Hinton, DE. 2008. (Eds). *The toxicology of fishes*. Crc Press.
- Ebele, AJ; Abdallah, MAE; Harrad, S. 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging contaminants*, 3, 1-16.
- Embry, MR; Belanger, SE; Braunbeck, TA; Galay-Burgos, M; Halder, M; Hinton, DE; Whale, G. 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat.Toxicol.* 97, 79-87.
- Fountoulakis M; Terzakis S; Kalogerakis N; Manios T. 2009. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. *Ecol. Eng.* 35, 1702–1709.
- Fuiman, L. 2002 Special consideration on fish eggs and larvae. *Fishery science: the unique contributions of early life stages*, p. 1-32.
- Gledhill, WE; Saeger, VW; Trehy, ML., 1991. An aquatic environmental safety assessment of linear alkylbenzene. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 169-178.
- Gomez V; Ferreres L; Pocurull E; Borrull F. 2011. Determination of nonionic and anionic surfactants in environmental water matrices. *Talanta*. 84, 859–866.
- Gouda, AM; Hagra, AE; Okbah, MA; El-Gammal, MI. 2022. Influence of the Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) on hematological and biochemical parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Saudi J. Biol. Sci.* 29, 1006-1013.
- Hagenmaier, H. 1974. The hatching process in fish embryos. V. Characterization of the hatching protease (chorionase) from the perivitelline fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* rich, as a metalloenzyme. *Wilhelm. Roux. Arch.* 175, 157–162.
- Hagenaars, A; Stinckens, E; Vergauwen, L; Bervoets, L; Knapen, D. 2014. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. *Aquat.Toxicol.* 157, 225-235.
- Hallare, AV; Kosmehl, T; Schulze, T; Hollert, H; Köhler, HR; Triebkorn, R. 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci.Total Environ.* 347, 254-271.
- Hawash, HB; Moneer, AA; Galhoum, AA; Elgarahy; AM, Mohamed; WA, Samy; M; Attia, NF. 2023. Occurrence and spatial distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment, their characteristics, and adopted legislations. *J. Water Process. Eng.* 52, 103490.
- HERA, 2012. Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products. Available in: <http://www.heraproject.com/>. Accessed in: 22 december 2022.
- HERA, 2013. HERA-LAS human and environmental risk assessment: linear alkylbenzene sulphonates, LAS. CAS No. 68411-30-3, February 2013. Available in: <http://www.heraproject.com/riskassessment.cfm>. Accessed in: 18 march 2022.
- Hilton, Z; Poortenaar, CW; Sewell, MA. 2008. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Mar. Biol.* 154, n. 5, p.855-865.

- Incardona, JP; Collier, TK.; Scholz, NL. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 191-205.
- Incardona, JP; Scholz, NL. 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquat.Toxicol.* 177, 515-525.
- Jezierska, B; Ługowska, K; Witeska, M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625-640.
- Jin, M; Zhang, X; Wang, L; Huang, C; Zhang, Y; Zhao, M. 2009. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Aquat.Toxicol.* 95, 347-354.
- Kamler, E. 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish biology and Fisheries.* v. 18, n. 2, p 143-200.
- Kasprzyk-Hordern, B; Dinsdale, RM; Guwy, AJ. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363-380.
- Korzh, S; Pan, X; Garcia-Lecea, M; Winata, CL; Pan, X; Wohland, T; Gong, Z. 2008. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 8, 1-15.
- Le Bihanic, F; Sommard, V; Pichon, A; Grasset, J; Berrada, S; Budzinski, H; Cachot, J. 2015. Environmental concentrations of benz [a] anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 321-328.
- Lema, SC; Schultz, IR; Scholz, NL; Incardona, JP; Swanson, P. 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat.Toxicol.* 82, 296-307.
- Lindsey, BW; Smith, FM; Croll, RP. 2010. From inflation to flotation: Contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7, 85-96.
- Mariappan, M; Karuppusamy, R. 2014. Effect of individual and coexposure of copper and cadmium on phosphatase activity in freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Int. J. Modn. Res. Revs.* 2, 116-12
- Marson, M; Tesolin, G; Matallo, M; Franco, D; Almeida, S; Jonsson, C; Moura, M. 2013. Mistura de herbicidas induz efeitos adversos em paulistinha (*Danio Rerio*). In: Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais. Campinas. Anais. Campinas: Instituto Biológico, 2013, p. 41.
- McIntyre, JK; Davis, JW; Incardona, JP; Stark, JD; Anulacion, BF; Scholz, N. L. 2014. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. *Sci. Total Environ.* 500-501, 173-180
- Muller, EB; Lin, S; Nisbet, RM. 2015. Quantitative adverse outcome pathway analysis of hatching in zebrafish with CuO nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11817-11824.
- Mustapha, DS; Bawa-Allah, KA. 2020. Differential toxicities of anionic and nonionic surfactants in fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 16754-16762.
- Niu, ZG; Zhang, K; Zhang, Y. 2016. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the coastal area of the Bohai Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.*, 107, 245-250.
- Nkpondion, NN; Ugwumba, OA; Esenowo, IK. 2016. The toxicity effect of detergent on enzymatic and protein activities of African mud catfish (*Clarias gariepinus*). *J Environ Anal Toxicol.* 6, 2161-0525.

- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2002. Dodecylbenzene and undecylbenzene (isomers Benzenes, C10-C16 alkyl derivative). Geneva: UNEP, p.79.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2013. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD guidelines for the testing of chemicals, Paris, France.
- Perales JA;Manzano; MA; Sales, D; Quiroga JM. 1999. Linear bAlkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. Bull. Environ. Contam.Toxicol. 63, 94-100.
- Rand, GM. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC press.
- Ribelles, A; Carrasco, C; Rosety, M; Aldana M. 1995a.A histochemical study of the biological effects of Sodium Dodecyl Sulphate on the intestine of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Ewtoxiwl. Environ. Saf. 32, 131-138.
- Ribelle, A; Carrasco, C; Rosety, M; Aldana M. 1995b.Morphological and histochemical changes on the liver and pancreas of giltheads, *Sparus aurata* L, induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate.Histol.Histopathol.10, 781- 787.
- Ritz, C; Baty, F; Streibig, JC; Gerhard, D. 2015. Dose-response analysis using R PloS one 10: e0146021.
- Robinson, HE; Strickler, JR; Henderson, MJ; Hartline, DK.; Lenz, PH. 2019. Predation strategies of larval clownfish capturing evasive copepod prey. Mar. Ecol. Prog. Ser. 614, 125-146.
- Rosety, M; Ribelles, A; Carrasco, C. 1997.A morphologicalstudy in the kidney and spleen of gilthead, *Sparus aurata* L., caused by sodiumdodecyl sulphate.Histol.Histopathol. 12, 925-929.
- Rosety, M; Ribelles, A; Rosety-Rodriguez, M; Carrasco, C; Ordonez, F.J; Rosety, JM; Rosety Plaza, M. 2000. Morpho-histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulphate on the digestive gland of the Portuguese oyster. Histol.Histopathol. 15, 1137-1143.
- Rosety, M; Ordonez FJ; Rosety-Rodriguez, M; Rosety, JM; Rosety, I; Carrasco, C; Ribelles A. 2001 Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS) and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. Histol.Histopathol. 16, 839–843
- Rosety, M; Ordonez, FJ; Rosety-Rodriguez, M; Rosety, JM; Rosety, I. 2003. In vitro acute toxicity of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the motility of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. Histol.Histopathol. 18, 475–478
- Samson, JC; Goodridge, R; Olobatuyi, F; Weis, JS. 2001. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). Aquat.Toxicol. 51, 369-376.
- Sandbacka, M; Christianson, I; Isomaa, B. 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish. A comparative study. Toxicol in Vitro .14,61–68.
- Scott, GR; Sloman, KA; Rouleau, C; Wood, C. M. 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 206, 1779-1790.
- Susmi, TS; Rebello, S; Jisha, MS; Sherief, PM. 2010. Toxic effects of sodium dodecyl sulfate on grass carp *Ctenopharyngodon Idella*. Fish Technol. 47,157–162.

- Van de Plassche, EJ; Brujin, JHM; Stephenson, RR; Marshall, SJ; Feijtel, TCJ; Belanger, SE. 1999. Predicted no-effect concentrations and risk characterization of four surfactants: linear alkyl benzene sulfonate alcohol ethoxylates, alcohol ethoxylates sulfates, and soap. *Environ. Toxicol. Chem.* 18,2653–2663.
- Vaughan, M; Van Egmond, R. 2010. The use of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo for the acute toxicity testing of surfactants, as a possible alternative to the acute fish test. *Altern. Lab. Anim.* 38, 231-238.
- Venhuis, SH; Mehrvar, M. 2004. Health effects, environmental impacts, and photochemical degradation of selected surfactants in water. *Int. J. photoenergy* 6, 115-125.
- Verge C; Moreno A; Bravo J; Berna JL. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Chemosphere* 44,1749–1757
- Versteeg, DJ; Rawlings, J.M. 2003. Bioconcentration and toxicity of dodecylbenzene sulfonate (C 12 LAS) to aquatic organisms exposed in experimental streams. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 0237-0246.
- Wang, Y; Zhang, Y; Li, X; Sun, M; Wei, Z; Wang, Y; Feng, X. 2015. Exploring the effects of different types of surfactants on zebrafish embryos and larvae. *Sci. rep.* 5, 10107.
- Winata, CL; Korzh, S; Kondrychyn, I; Korzh, V; Gong, Z. 2010. The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. *BMC Dev. Biol.* 10, 1-9.
- Yang, Y; Qi, S; Chen, J; Liu, Y; Teng, M; Wang, C. 2016. Toxic effects of bromothalonil and flutolanil on multiple developmental stages in zebrafish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 91-97.
- Zagatto, PA; Bertoletti, E. 2008. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed. São Carlos: RiMa, 486 p.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos utilizando compostos indicadores de esgoto, como os LABs e LAS, no Norte e Nordeste do Brasil, ainda são muito escassos, o que torna este trabalho pioneiro numa importante região do Brasil. A implantação da metodologia desses marcadores no laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR) da UFPE, abrirá possibilidades de parcerias com pesquisadores de outras localidades, firmando uma rede de investigação da contaminação ambiental em ambientes costeiros. Desta forma, será possível gerar um banco de dados mais completo e representativo quanto a ocorrência de esgotos em diversas áreas da costa brasileira.

O presente estudo forneceu informações importantes sobre os níveis de contaminação das águas e sedimentos do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC) por compostos indicadores de esgoto doméstico. Neste ambiente, a água foi caracterizada como altamente contaminada por LAS e os sedimentos moderadamente contaminados por LABs, nos diferentes períodos do ano.

A integração dos dados sobre a ocorrência ambiental e os efeitos ecotoxicológicos são fundamentais para o entendimento da extensão da contaminação. Este estudo mostrou que ambos os compostos (LAS e LAB), em concentrações ambientalmente relevantes para a área de estudo, são tóxicos para a fase embriolarval do *Danio rerio*, podendo interferir no desenvolvimento e sobrevivência desses organismos. Isto alerta para possíveis riscos sobre o equilíbrio ecológico da região, e consequentemente para a população local que consome e depende dos recursos pesqueiros. Não só no litoral pernambucano, mas em toda a costa brasileira, outros estudos devem ser conduzidos, integrando a química e a ecotoxicologia, para que relações de causa-efeito possam ser mais bem avaliados. Inclusive, é importante que outros organismos da cadeia trófica e em diferentes estágios de vida, sejam testados para a obtenção de um panorama mais completo dos impactos desses compostos em ecossistemas como o SERC. Testes utilizando a combinação desses dois compostos também são altamente encorajados, uma vez que estes são liberados em conjunto nos ambientes aquáticos, podendo induzir efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos dos mesmos.

Mesmo não contemplando todos estes aspectos, este estudo apresenta informações fundamentais que contribuem para uma melhor compreensão da qualidade ambiental do SERC e esta proposta poderá servir de referência para o monitoramento e gerenciamento da contaminação por esgoto no futuro nesta e em outras áreas costeiras. Além disso, estes

resultados podem auxiliar na tomada de decisões pelos órgãos governamentais quanto aos níveis de tolerância desses compostos no ambiente e a criação de leis específicas para os LAS e LABs nas diferentes matrizes dos ambientes costeiros.

REFERÊNCIAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) 1989. **Água - Determinação de surfactantes aniônicos pelo método espectrofotométrico do azul-demetileno**, Rio de Janeiro - RJ, p.7.
- ABRIL, G; COMMARIEU, MV; MARO, D; FONTUGNE, M; GUÉRIN, F; ETCHEBER, H. 2004. A massive dissolved inorganic carbon release at spring tide in a highly turbid estuary. **Geophys. Res. Lett.** 31, 1-4.
- AIDAR, E; SIGAUD-KUTNER, TCS; NISHIHARA L; SCHINKE KP; BRAGA, MCC; FARAH RE; KUTNER, MBB. 1997. Marine phytoplankton assays: effects of detergents. **Mar. Environ. Res.** 41, 1-14.
- AL-JAMAL, O; AL-JIGHEFEE, H; YOUNES, N; ABDIN, R; AL-ASMAKH, MA; RADWAN, AB; NASRALLAH, GK. 2020. Organ-specific toxicity evaluation of stearamidopropyl dimethylamine (SAPDMA) surfactant using zebrafish embryos. **Sci. Total Environ.** 741, 140450.
- ALKHADHER, SAA; ZAKARIA, MP; YUSOFF, FM; KANNAN, N; SURATMAN, S; KESHAVARZIFARD, M; MAGAM, SM; MASOOD, N; VAEZZADEH, V; SANI, MSA. 2015. Baseline distribution and sources of linear alkyl benzenes (LABs) in surface sediments from Brunei Bay, Brunei. **Mar. Pollut. Bull.** 101, 397–403.
- ALKHADHER, SAA; ZAKARIA, MP; YUSOFF, FM; KANNAN, N; SURATMAN, S; MAGAM, SM. 2016. Distribution and sources of linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments from Johor Bahru Coast and the Kim Kim River, Malaysia. **Environ. Forensic** 17, 36–47.
- ALKHADHER, SAA; KADIR AA; ZAKARIA, MP; AL-GHEETHI, A; KESHAVARZIFARD M; MASSOD, N; ALENEZI, KM; MAGAM, SM. 2020. Linear alkylbenzenes in surface sediments of an estuarine and marine environment in peninsular Malaysia. **Mar. Pollut. Bull.** 153, 1–10.
- ALMEIDA, M.G., REZENDE, C.E., SOUZA, C.M.M., 2007. Variação temporal, transporte e partição de Hg e carbono orgânico nas frações particulada e dissolvida da coluna d'água da bacia inferior do rio Paraíba do Sul, RJ, Brasil. **Geochim. Brasiliensis** 21, 111–128.
- ALMEIDA, JC. 2021. **Biocidas de terceira geração no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- ÁLVAREZI-MUÑOZ, D; GOMEZ-PARRA, A; BLASCO, J; SARASQUETE, C; GONZALEZ´MAZO, E. 2009. Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese sole. **Chemosphere** 74, 1216-1223.
- ALVES, RN; MARIZ JR, CF; DE MELO ALVES, MK.; CAVALCANTI, MGN; DE MELO, TJB; DE ARRUDA-SANTOS, R. H; CARVALHO, PS. 2021. Contamination and toxicity of surface waters along rural and urban regions of the Capibaribe River in tropical northeastern Brazil. **Environ. Toxicol.Chem.** 40, 3063-3077.
- AMIARD-TRIQUET, C; AMIARD, J; MOUNEYRAC, C. 2015. **Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks**. Academic press.
- ANA (Agência Nacional das Águas). 2017. **Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas**.
- ANDERSSON, K; ROSEMARIN, A; LAMIZANA, B; KVARNSTROM, E; MCCONVILLE, J; SEIDU, R; DICKIN, S; TRIMMER, C. 2016. **Sanitation, waste water management and sustainability: from waste disposal to resource recovery**. 2nd edition. Nairobi and Stockholm: United Nations Environment Programme and Stockholm Environment Institute, p. 150.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Resolução RE nº899 de 29/05/2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- APAC (Agência Pernambucana de Águas e Climas. 2023 **Série histórica do monitoramento pluviométrico mensal na cidade de Recife (1980-2023)**. Available in: <http://old.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>. Accessed in: 14 April 2023.

APHA, 1998. American Public Health Association – **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, New York, 20 ed.

ARAÚJO, AM; MINEIRO, ALB; CANTALICE, JR DE B. 2011. Estimativa do potencial de sedimentação e erosão: caso Manguezal do Pina, Recife (PE). **Eng. Sanit. Ambient.** 16, 133–140.

ARAÚJO FREITAS, JB; CABRAL, JJDSP; LUIZ, A; PAIVA, R; ALBUQUERQUE, TBV; NASCIMENTO SILVA, NB. 2018. **Qualidade de água de um trecho urbano do Rio Beberibe na Região Metropolitana de Recife.**

ARRUDA-SANTOS, RH; SCHETTINI, CAF; YOGUI, GT; MACIEL, DC; ZANARDI-LAMARDO, E. 2018. Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. **Sci. Total Environ.** 624, 935–944.

ARRUDA-SANTOS, RH; COSTA, BVM; CARVALHO, PSM; ZANARDI-LAMARDO, E. 2023. Sewage contamination assessment in an urbanized tropical estuary in Northeast Brazil using elemental, isotopic and molecular proxies. **Environ. Pollut.** 317, 120726.

ARTIFON, V; ZANARDI-LAMARDO, E; FILLMANN, G. 2019. Aquatic organic matter: classification and interaction with organic microcontaminants. **Sci. Total Environ.** 649, 1620-1635.

BAKHTIARI, AR; JAVEDANKHERAD, I; MOHAMMADI, J; TAGHIZADEH, R. 2018. Distribution of linear alkylbenzenes as a domestic sewage molecular marker in surface sediments of International Anzali Wetland in the southwest of the Caspian Sea, Iran. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 25, 20920-20929.

BARBIERI, E; PHAN, NG; GOMES, V. 2000. Efeito do LAS-C12, Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear, na taxa metabólica e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicol. Environ. Res.** 3, 69-75.

BARBIERI, E. 2005. Efeito do LAS-C12 (dodecil benzeno sulfonato de sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da tainha (*Mugil platanus*). **Atlântica** 27, 49-57.

BARBIERI, E. 2008. Efeito dos Surfactantes DSS e LAS-C12 sobre o Camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensi*, Pérez-Farfante, 1967). **J. Braz. Soc. Ecotox.** 3, 35-40.

BARBOSA, CF; SUGUIO, K. 1999. Biosedimentary facies of a subtropical microtidal estuary; an example from southern Brazil. **J. Sediment. Res.** 69, 576-587.

BARCELLOS, RL; FURTADO, VV. 2006. Organic matter contents and modern sedimentation at São Sebastião Channel, São Paulo State, south-eastern Brazil. **J. Coast. Res.** 1073-1077.

BARCELLOS, R. L.; ALVES, C. S.; FETTER FILHO, A. 2016. **Geoquímica e Dinâmica Sedimentar do Sistema Estuarino do Rio Goiana: Sedimentação atual e indicadores ambientais da matéria orgânica em um sistema estuarino tropical no Nordeste do Brasil.** 1 ed. Saarbrücken, Alemanha: Novas Edições Acadêmicas (NEA) 1, p 89.

BASTOS, RF; LIPPI, DL; GASPAR, ALB; YOGUI, GT; FRÉDOU, T; GARCIA, AM; FERREIRA, BP. 2022. Ontogeny drives allochthonous trophic support of snappers: Seascape connectivity along the mangrove-seagrass-coral reef continuum of a tropical marine protected area. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 264, 107591.

BAUMGARTEN, MGZ; ROCHA, JMB; NIENCHESHII, LFH. 1996. **Manual de análises em oceanografia química.** Rio Grande: Editora da FURG.

BAO-QUEY, H; DAR-YI, W. 1994. Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the respiratory functions of Tigerperch (*Terapon jarbua*). **Zool. Stud.** 33, 205–210.

BARDACH, JE; FUJIYA, M; HOLL, A. 1965. Detergent: effect on the chemical senses of the fish *Ictalurus natalis* (Le Suer). **Science** 148, 1605– 1607.

BEEKHUIJZEN, M; DE KONING, C; FLORES-GUILLÉN, ME; DE VRIES-BUITENWEG, S; TOBOR-KAPLON, M; VAN DE WAART, B; EMMEN, H. 2015. 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. **Reprod. Toxicol.** 56, 64-76.

BENBOW, TJ; FREW, RD; HAYMAN, AR. 2008. Validation of a rapid and simple method for the preparation of aqueous organic compounds prior to compound specific isotope analysis. **Org. Geochem.** 39, 1690-1702.

- BENON, P; BLANC, F; BOURGADE, B. 1976. **Golfe de Fos: impact de la pollution**. Fondation scientifique Ricard, Observatoire de la mer.
- BERGÉ, A; WIEST, L; BAUDOT, R; GIROUD, B; VULLIET, E, 2018. Occurrence of multi-class surfactants in urban wastewater: contribution of a healthcare facility to the pollution transported into the sewerage system. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 25, 9219-9229.
- BIANCHI, TS. 2007. **Estuarine Science and Biogeochemical Cycles**. In: Biogeochemistry of Estuaries. Ed. Oxford University Press. Chapter 1, p. 3.
- BIANCHI, TS; CANUEL, EA. 2011. **Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems**. Princeton University Press.
- BINETTI, R; ATTIAS, L; DI MARZIO, G; CALCINAI, D; CAVALLI, L. 2000. Environmental risk assessment of linear alkyl benzene, an intermediate for the detergent industry. **Int. J. Environ. Health Res.** 10, 153-172.
- BLOT, MLP. 2003. **Os portos na origem dos centros urbanos**. Instituto português de arqueologia.
- BONFIM, JH; SILVA, LGD; GAVAZZA, S; FLORENCIO, L; KATO, MT. 2016. **Remoção de alquilbenzeno linear sulfonato em esgoto doméstico tratado em reator UASB e lagoa de polimento**. Engenharia Sanitária e Ambiental, 21, 397-406.
- BOUILLON, S; CONNOLLY, RM; GILLIKIN, DP. 2011. **Use of stable isotopes to understand food webs and ecosystem functioning in estuaries**. In: E. Wolanski; McLusky D. S. (Eds.); Treatise on Estuarine and Coastal Science. Waltham: Academic Press. 7th ed., 143–173.
- BRASIL (Ministério do Meio Ambiente), 2005. Resolução n.357/2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Available in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Accessed date: 18 de December 2022.
- BRASIL (Ministério do Meio Ambiente), 2011. Resolução n.430/2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**. Available in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Accessed date: 18 December 2022.
- BUERGE, IJ; BUSER, HR; MULLER, MD; POIGER, T. 2003. Behavior of the polycyclic musks HHCB and AHTN in lakes, two potential anthropogenic markers for domestic wastewater in surface waters. **Environ. Sci. Technol.** 37, 5636-5644.
- BYAPPANAHALLI, MN; ROLL, BM; FUJIOKA, RS. 2012. Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. **Microbes environ.** 27, 164-170.
- CABRAL, CB. 2014. **Variabilidade longitudinal e mareal das concentrações de hidrocarbonetos de petróleo no estuário do Rio Capibaribe**. Trabalho de Conclusão de curso (Ciências Biológicas com Ênfase em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- CABRAL, AC; MARTINS, CC. 2018. Insights about sources, distribution, and degradation of sewage and biogenic molecular markers in surficial sediments and suspended particulate matter from a human-impacted subtropical estuary. **Environ. Pollut.** 241, 1071-1081.
- CABRAL, AC; STARK, JS; KOLM, HE; MARTINS, CC. 2018. An integrated evaluation of some faecal indicator bacteria (FIB) and chemical markers as potential tools for monitoring sewage contamination in subtropical estuaries. **Environ. Pollut.** 235, 739-749.
- CANUEL, EA; HARDISON, AK. 2016. Sources, ages, and alteration of organic matter in estuaries. **Annu. Rev. Mar. Sci.** 8, 409-434.
- CARBALLA, M; OMIL, F; LEMA, JM. 2005. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. **Water Res.** 39, 4790–4796.
- CARRERA, R; WAGENER, A; FILEMAN, T; READMAN, J. 2001. Distribuição de coprostanol (5 β (H)-coletan-3 β -ol) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Quim. Nova** 24, 37-42.

- CAVALCANTE, R.M. 2007. **Otimização de metodologias de extração e análise de HPAs para determinação da distribuição ambiental e estimativa de fontes na cidade de Fortaleza**. Tese de Doutorado (Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CAVALCANTE, RF; MARINHO, GM; BARBOSA, BCA, 2014. Impactos Ambientais do Alquilbenzeno Sulfonado Linear/Environmental Impacts of Linear Alkyl Benzene Sulfonate. **HOLOS** 30, 135.
- CEDRON, VP; WEINER, AM; VERA, M; SANCHEZ, L. 2020. Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Biochem. Pharmacol.** 174, 113816.
- CERNUSAK, LA; UBIERNA, N; WINTER, K; HOLTUM, JÁ; MARSHALL, JD; FARQUHAR, GD. 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. **New Phyt.** 200, 950-965.
- CETESB. 1978. **Poliuição das águas no Estuário e Bahia de Santos**. São Paulo, CETESB. v.2.
- CETESB, 2007. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Emissários Submarinos: projeto, avaliação de impacto ambiental e monitoramento**. São Paulo: CETESB.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado do São Paulo). 2014. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo**. p. 1 – 374.
- CHANTON, JP; LEWIS, FG. 1999. Plankton and Dissolved Inorganic Carbon Isotopic Composition in a River-Dominated Estuary: Apalachicola Bay, Florida. **Estuaries** 22, 575-583.
- CLARA, M; SCHARF, S; SCHEFFKNECHT, C; GANS, O. 2007. Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. **Water Res.** 41, 4339-4348.
- CLARKE KR; WARWICK RM. 2001. **Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation**. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory
- CLARKE, KR; GORLEY, RN. 2006. **Primer: User Manual/Tutorial**. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Água e Saneamento), 2019. **Nota técnica sobre os sistemas de esgotamentos sanitários da Região Metropolitana do Recife**. Pernambuco: Companhia Pernambucana de Saneamento.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Água e Saneamento), 2020. Mensagem pessoal recebida de <ouvidoriacompesa@compesa.com.br> em 21 out. 2020.
- COMPESA (Companhia Pernambucana de Saneamento). 2021. Available in: <https://servicos.compesa.com.br/>. Request for Access to Information number 202149257.
- CONDE, LV. 2021. **Indicadores de esgoto doméstico nos sedimentos do sistema estuarino do Rio Capibaribe**. Trabalho de Conclusão de Curso (Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- COPLEN, TB. 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 25, 2538–2560.
- CORADA-FERNÁNDEZ, C; LARA-MERTÍN, PA; CANDELA, L; GONZÁLEZ-MAZO, E. 2011. Tracking sewage derived contamination in riverine settings by analysis of synthetic surfactants. **J. Environ. Monitor.** 13, 2010-2017.
- CORREIA, M; MACIEL, C; NASCIMENTO, L; JÚNIOR, AM. 2010. Ontogenia da pigmentação das larvas de três espécies de Characiformes, criadas em incubatório. **Enciclopédia biosfera** v.6, 11.
- COSTA, CR; OLIVI, P; BOTTA, CM, ESPINDOLA, EL. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova.** 31, 1820-1830.
- COSTA, BVM. 2018. Origem e degradação da matéria orgânica em um estuário tropical eutrofizado. **Trop. Oceanog.** 46, 25-47.
- COSTA, BVM; MOREIRA, MZ; BASTOS RF; YOGUI, GT. 2021a. Distribution and origin of sedimentary organic matter in an eutrophic estuary: Pina Sound – NE Brazil. **An. Braz. Acad. Sci.** 93, 20190638.

- COSTA, BVM; SANTOS, PJP; YOGUI, GT. 2021b. Origin and Distribution of Total Organic Matter and Aliphatic Hydrocarbons in Sedimentary Fractions of a Highly Urbanized, Tropical Estuary. **Estuaries Coast.** 81, 1-12.
- CPRH (Agência Estadual do Meio Ambiente). 2015. **Unidades de conservação estaduais de Pernambuco.** Recife.
- COTOVICZ JR, LC; KNOPPERS, BA; DEIRMENDJIAN, L; ABRIL, G. 2019. Sources and sinks of dissolved inorganic carbon in an urban tropical coastal bay revealed by $\delta^{13}\text{C}$ -DIC signals. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 220, 185-195.
- CSERHÁTI, T; FORGÁCS, E; OROS, G. 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment Inter.** 28, 337-348.
- CZESNY, SJ; GRAEB, BD; DETTMERS, JM. 2005. Ecological consequences of swim bladder noninflation for larval yellow perch. **Trans. Am Fish Soc.** 134, 1011-1020.
- DAUNER, ALL; MARTINS, CC. 2015. Spatial and temporal distribution of aliphatic hydrocarbons and linear alkylbenzenes in the particulate phase from a subtropical estuary (Guaratuba Bay, SW Atlantic) under seasonal population fluctuation. **Sci. Total Environ.** 536, 750-760.
- DEBRUYN, AM; RASMUSSEN, J. B. 2002. Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. **Ecol. Appl.** 12, 511-520.
- DENOUX, G.; WANG, B., 1998. Quantitative determination of polynuclear aromatic hydrocarbons by gas chromatography/mass spectrometry using the selected ion monitoring mode. **Geochemical and Environmental Research Group** 3, 2 – 28.
- DETEN QUÍMICA S. A. 2013. **Ficha de informações de segurança de produto químico: Linear Alquilbenzeno.** Disponível em: http://www.deten.com.br/Files/pdf/produtos/detlab240/FISPQ_LAB_portugues.pdf.
- DI GIULIO, R. T.; CLARK, B. W. 2015. The Elizabeth River Story: A Case Study in Evolutionary Toxicology. **J. Toxicol. Environ. Health Part B** 18, 259-298.
- DÖBEREINER, C. 1982. **Aggregation and deposition of fine particles in the Tay estuary.** Scotland, UK. Tese (Doutorado em Filosofia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Dundee, p. 151.
- DONG, X; JOCHMANN, MA; ELSNER, M; MEYER, AH; BACKER, LE; RAHMATULLAH, M; SCHUNK, D; LENS, G; MECKENSTOCK, RU. 2017. Monitoring Microbial Mineralization Using Reverse Stable Isotope Labeling Analysis by Mid-Infrared Laser Spectroscopy. **Environ. Sci. Technol.** 51, 11876-11883.
- DYER, KR. 1995. **Sediment transport processes in estuaries.** In: Perillo, G.M.E. (Ed.), *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Elsevier, New York, 423–449.
- EBELE, AJ; ABDALLAH, MAE; HARRAD, S. 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerg. Contam.** 3, 1-16.
- EGANHOUSE, RP; BLUMFIELD, DL; KAPLAN, IR. 1983. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. **Environ. Sci. Technol.** 17, 523–530.
- EGANHOUSE, RP. 1997. **Molecular markers and environmental organic geochemistry: An overview.** p. 1-20.
- EGANHOUSE, R; SHERBLOM, PM. 2001. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. **Mar. Environ. Res.**, 51, 51–74.
- EICHHORN, P; RODRIGUES, SV; BAUMANN, W; KNEPPER, TP. 2002. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. **Sci. Total Environ.** 284, 123-134.
- EMBRY, MR; BELANGER, SE; BRAUNBECK, TA; GALAY-BURGOS, M; HALDER, M; HINTON, DE; WHALE, G. 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquat. Toxicol.** 97, 79-87.

- FAIRBRIDGE, RW. 1980. **The estuary: its definition and geodynamic cycle.** Chemistry and biogeochemistry of estuaries, 1136.
- FAIRCHILD, JF; DWYER, FJ; LA POINT, TW; BURCH, SA; INGERSOLL, CG. 1993. Evaluation of a laboratory-generated NOEC for linear alkylbenzene sulfonate in outdoor experimental streams. **Environ. Toxicol. Chem.** 12, 1763-1775.
- FAVROD, N. 2012. **Determinação de hidrocarbonetos do petróleo dissolvidos e/ou dispersos nas águas do complexo estuarino da Bacia do Pina-Bacia Portuária (Porto de Recife).** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas/Ambientais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- FEITOSA, F; PASSAVANTE, J. 1991. **Distribuição espacial e temporal da biomassa primária do fitoplâncton na bacia do Pina (Recife-Pernambuco-Brasil).** Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 22, 65-82.
- FEITOSA, FAN; NASCIMENTO, FCR; COSTA, KMP. 1999. **Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplancônica relacionada com parâmetros hidrológicos na Bacia do Pina, Recife-PE.** Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco (ISSN: 1679-3013) 27, 1-13.
- FERNANDES, MB; SICRE MA; CARDOSO JN; MACÊDO SJ. 1999. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. **Sci. Total Environ.** 231, 1-16.
- FLEMMING, BW. 2000. A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis ternary diagrams. *Cont. Shelf Res.* 20, 1125-1137.
- FLORES MONTES, MDJ; PAULO, JG; NASCIMENTO FILHO, GA; GASPAR, FL; FEITOSA, FA; SANTOS JUNIOR, AC; BATISTA, T NF; TRAVASSOS, RK; PITANGA, ME. 2011. The trophic status of an urban estuarine complex in Northeast Brazil. **J. Coast. Res.** 64, 408-411.
- FOUNTOULAKIS M; TERZAKIS S; KALOGERAKIS N; MANIOS T. 2009. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. **Ecol. Eng.** 35, 1702-1709.
- FROEHNER, S; MARTINS, RF. 2008. Avaliação da composição química de sedimentos do Rio Barigüi na região metropolitana de Curitiba. **Quím. Nova.** 31, 2020-2026.
- FUIMAN, L. 2002 Special consideration on fish eggs and larvae. **Fishery science: the unique contributions of early life stages**, 1-32.
- GAO, X; YANG, Y; WANG, C. 2012. Geochemistry of organic carbon and nitrogen in surface sediments of coastal Bohai Bay inferred from their ratios and stable isotopic signatures. **Mar. Pollut. Bull.** 64, 1148-1155.
- GARDINGO, M.F. 2010. **Tratamento de águas e efluentes contendo surfactantes através do sistema peróxido de hidrogênio / hipoclorito.** Dissertação de Mestrado (Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- GASPAR FL; PINHEIRO BR; NORIEGA CED; ARAUJO M; LEFÈVRE N; MONTES MDJF. 2018. Alkalinity, inorganic carbon and CO₂ flux variability during extreme rainfall years (2010-2011) in two polluted tropical estuaries NE Brazil. **Braz. J. Oceanogr.** 66, 115-130.
- GEARING, JN. 2013. The use of stable isotope ratios for tracing the nearshore-offshore exchange of organic matter. In: **Coastal-Offshore Ecosystem Interactions: Proceedings of a Symposium sponsored by SCOR, UNESCO, San Francisco Society, California Sea Grant Program, and US Dept. of Interior, Mineral Management Service held at San Francisco State University, Tiburon, California, April 7-22, 1986.** Springer Berlin Heidelberg, 1988. p. 69-101.
- GIREESHKUMAR, TR; DEEPULAL, PM; CHANDRAMOHANAKUMAR, N. 2013. Distribution and sources of sedimentary organic matter in a tropical estuary, south west coast of India (Cochin estuary): A baseline study. **Mar. Pollut. Bull.** 66, 239-245.
- GLEDHILL, WE; SAEGER, VW; TREHY, ML. 1991. An aquatic environmental safety assessment of linear alkylbenzene. **Environ. Toxicol. Chem.** 10, 169-178.
- GOMEZ V; FERRERES L; POCURULL E; BORRULL F. 2011. Determination of nonionic and anionic surfactants in environmental water matrices. **Talanta** 84, 859-866.

- GONZÁLEZ-MAZO, E; LEÓN, VM; SÁEZ M; GÓMEZ-PARRA, A. 2002. Occurrence and distribution of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids in several Iberian littoral ecosystems. **Sci. Total Environ.** 288, 215-226.
- GONZALEZ S; PETROVIC M; BARCELO D. 2004. Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). **J Chromatography A** 1052, 111–120.
- GOUDA, AM; HAGRAS, AE; OKBAH, MA; EL-GAMMAL, MI. 2022. Influence of the Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) on hematological and biochemical parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Saudi J. Biol. Sci.** 29, 1006-1013.
- GRANATTO, CF; MACEDO, TZ; GEROSA, LE; SAKAMOTO, IK; SILVA, EL; Varesche, MBA. 2019. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. **Inter. Biodeterior. Biodegradation** 138, 23-32.
- GRIFFIN, DW; LIPP, EK.; MCLAUGHLIN, MR; ROSE, JB. 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. **Bio Sci.** 51, 817–825.
- HAGENAARS, A; STINCKENS, E; VERGAUWEN, L; BERVOETS, L; KNAPEN, D. 2014. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. **Aquat. Toxicol.** 157, 225-235.
- HAGENMAIER, H. 1974. The hatching process in fish embryos. V. Characterization of the hatching protease (chorionase) from the perivitelline fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* rich, as a metalloenzyme. **Wilhelm. Roux. Arch.** 175, 157–162.
- HAIGH, SD. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Sci. Total Environ.** 185, 161-170.
- HALLARE, AV; KOSMEHL, T; SCHULZE, T; HOLLERT, H; KÖHLER, HR; TRIEBSKORN, R. 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Sci.Total Environ.** 347, 254-271.
- HAMPEL, M., J.B. ORTIZ-DELGADO, C. SARASQUETE, AND J. BLASCO. 2008. Effects of sediment sorbed linear alkylbenzene sulphonate on juveniles of the Senegal sole, *Solea senegalensis*: Toxicity and histological indicators. **Histol. Histopathol.** 23, 14.
- HAMPEL, M; MAUFFRET, A; PAZDRO, K; BLASCO, J. 2012. Anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sediments from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic Sea, Poland) and its environmental implications. **Environ. Monitor. Assess.** 184, 6013-6023.
- HARTMANN, PC; QUINN, J; KING, JW; TSUTSUMI, S; TAKADA, H. 2000. Intercalibration of LABs in Marine Sediment SRM 1941a and their application as amolecular marker in Narragansett Bay sediments. **Environ. Sci. Technol.** 34, 900-906.
- HAWASH, HB; Moneer, AA; Galhoum, AA; Elgarahy; AM, Mohamed; WA, Samy; M; Attia, NF. 2023. Occurrence and spatial distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment, their characteristics, and adopted legislations. **J. Water Process. Eng.** 52, 103490.
- HEDGES, JL; STERN, JH. 1984. Carbon and nitrogen determination of carbonate-containing solids. **Limnol.Oceanogr.** 29, 657–663.
- HERA. 2007. Human and environmental risk assesment on ingredients of European household cleaning products-linear alkylbenzene sulphonate, LAS - Linear Alkylbenzene sulphonate. Disponível em: <http://www.heraproject.com>.
- HERA, 2012.**Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products**. Available in: <http://www.heraproject.com/>. Accessed in: 22 december 2022.

HERA, 2013. **HERA-LAS human and environmental risk assessment: linear alkylbenzene sulphonates, LAS**. CAS No. 68411-30-3, February 2013. Available in: <http://www.heraproject.com/riskassessment.cfm>. Accessed in: 18 march 2022.

HERNANDES, JC. 2009. **Determinação de marcadores orgânicos no perfil sedimentar do complexo estuarino de Paranaguá (PR) por CG-EM**. Dissertação de Mestrado (Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

HILTON, Z; POORTENAAR, CW; SEWELL, MA. 2008. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). **Mar. Biol.** 154, 855-865.

HUANG, C; CHEN, F; ZHANG, S; CHEN, C; MENG, Y; ZHU, Q; SONG, Z. 2020. Carbon and nitrogen isotopic composition of particulate organic matter in the Pearl River Estuary and the adjacent shelf. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 246, 107003.

HOWE, K; CLARK, MD; TORROJA, CF; TORRANCE, J; BERTHELOT, C; MUFFATO, M; TEUCKE, M. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature** 496, 498-503.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2017. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**. Available in: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/pesquisa/30/84366?ano=2017>. Accessed date: 02 February 2022.

IBGE, 2019. **Censo Demográfico 1900, 1920, 1940, 1950, 1960, 1970, 1980, 1991, 2000 e 2010. Recife – Pernambuco**. Consulta online: <https://censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=6&uf=00> (Acessado em: 20 de outubro de 2019).

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2021. **Demographic Census of Recife city – Pernambuco**. Available in: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/panorama>. Accessed date: 20 October 2021.

IDE, AH; CARDOSO, FD; SANTOS, MM; KRAMER, RD; AZEVEDO, JCR; MIZUKAWA, A. 2013. Utilização da cafeína como indicador de contaminação por esgotos domésticos na bacia do Alto Iguaçu. **Rev. Bras. de Recur. Híd.** 18, 201-211.

INCARDONA, JP; COLLIER, TK.; SCHOLZ, NL. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 196, 191-205.

INCARDONA, JP; SCHOLZ, NL. 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. **Aquat. Toxicol.** 177, 515-525.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), 2020. Normais climatológicas do Brasil (1961 - 1990). Brasília. Accessed date: 22 December 2020.

INMETRO, 2020. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQCGCRE-008.

INSTITUTO TRATA BRASIL. 2023. **Ranking do Saneamento do Instituto Trata Brasil 2023 (SNIS 2021)**. 4º ed. São Paulo. p. 118.

ISOBE, KO; ZAKARIA, M; CHIEM, N; MINH, L; PRUDENTE, M; BOONYATUMANOND, R; SAHA, M; SARKAR, S; TAKADA, H. 2004. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Res.** 38, 2449–2459.

JARDÉ, E; MANSURY, L; FAURE, P. 2005. Organic markers in the lipidic fraction of sewage sludges. **Water Res.** 39, 1215–1232.

JEZIERSKA, B; ŁUGOWSKA, K; WITESKA, M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). **Fish Physiol. Biochem.** 35, 625-640.

JIFA, W; YU., Z; XIUXIAN, S; YOU, W. 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo(a)pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 65, 230-236.

JIN, M; ZHANG, X; WANG, L; HUANG, C; ZHANG, Y; ZHAO, M. 2009. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. **Aquat. Toxicol.** 95, 347-354.

- KAISER, HF. 1970. A second generation little jiffy. **Psychometrika**, 35, 401–415.
- KAMLER, E. 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Reviews in Fish biology and Fisheries**, 18, 143–200.
- KASPRZYK-HORDERN, B; DINSDALE, RM; GUWY, AJ. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res.** 43, 363–380.
- KOGA, M; YAMAMICHI, Y; NOMOTO, Y; IRIE, M; TANIMURA, T; YOSHINAGA, T. 1999. Rapid determination of anionic surfactants by improved spectrophotometric method using methylene blue. **Anal. Sci.** 15, 563–568.
- KOPPRIO, GA; DUTTO, MS; CARDONA, JG; GÄRDES, A; LARA, RJ; GRAEVE, M. 2018. Biogeochemical markers across a pollution gradient in a Patagonian estuary: A multidimensional approach of fatty acids and stable isotopes. **Mar. Pollut. Bull.** 137, 617–626.
- KORZH, S; PAN, X; GARCIA-LECEA, M; WINATA, CL; PAN, X; WOHLAND, T; GONG, Z. 2008. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. **BMC Dev. Biol.** 8, 1–15.
- KOWALEWSKA, G; KONAT, J. 1997. The role of phytoplankton in the transport and distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in the southern Baltic environment. **Oceanologia** 39, 267–277.
- KRUGER, CJ; RADAKOVICH, KM; SAWYER, TE; BARBER, L. B., SMITH, RL; FIELD, JA. 1998. Biodegradation of the surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage-contaminated groundwater: A comparison of column experiments and field tracer tests. **Environ. Sci. Technol.** 32, 3954–3961.
- LAMPARELLI, M. C.; COSTA, M. P.; PRÓSPERI, V. A.; BEVILACQUA, J. E.; ARAUJO, R. P. A.; EYSINK, G. G. J.; POMPÉIA, S., 2001. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. São Paulo: CETESB. p. 178.
- LANÇAS, F., 2004. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Editora RiMa: São Paulo, p. 9–28.
- LARA-MARTÍN, PA; CORADA-FERNÁNDEZ, C; GÓMEZ-PARRA, A; GONZÁLEZ-MAZO, E. 2010. Seasonal changes in the concentration of anionic surfactants in estuarine sediments from the River Guadalete (Cadiz, Spain). **Sci. Mar.** 74, 125–131.
- LARSON, RJ; ROTHGEB, TM; SHIMP, RJ; WARD, TE; VENTULLO, RM. 1993. Kinetics and practical significance of biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in the environment. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 70, 645–657.
- LAUENSTEIN, G.G., CANTILLO, A.Y. 1998. **Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project**. 1993–1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA. pp. 130–233.
- LE BIHANIC, F; SOMMARD, V; PICHON, A; GRASSET, J; BERRADA, S; BUDZINSKI, H; CACHOT, J. 2015. Environmental concentrations of benz [a] anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 113, 321–328.
- LECHUGA, M; FERNÁNDEZ-SERRANO, M; JURADO, E; NÚÑEZ-OLEA, J; RÍOS, F; 2016. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 125, 1–8.
- LEE, BK. 1970. The effect of anionic and nonionic detergents on soil microfungi. **Can. J. Bot.** 48, 583–589.
- LEHMANN, MF; BERNASCONI, SM; BARBIERI, A; MCKENZIE, JA. 2002. Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis. **Geochim. Cosmochim** 66, 3573–3584.
- LEMA, SC; SCHULTZ, IR; SCHOLZ, NL; INCARDONA, JP; SWANSON, P. 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). **Aquat. Toxicol.** 82, 296–307.

- LEMOS, RTO; CARVALHO, PSM; ZANARDI-LAMARDO, E. 2014. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. **Mar. Pollut. Bull.** 82, 183-188.
- LEON, VM; GOMEZ-PARRA, A; GONZALE-MAZO, E. 2004. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater. **Environ. Sci. Technol.** 38, 2359-2367.
- LEÓN, VM; GÓMEZ-PARRA, A; RUBIO, JÁ; GONZÁLEZ-MAZO, E. 2011. **Sorption of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids on marine sediments.** Repositorio Instituto Espanol de Oceanografia, Madrid, Spain.
- LIM, FY; ONG, SL; HU, J. 2017. Recent advances in the use of chemical markers for tracing wastewater contamination in aquatic environment: a review. **Water.** 9, 1– 26.
- LIM, FY; ONG, SL; HU, J. 2017. Recent advances in the use of chemical markers for tracing wastewater contamination in aquatic environment: a review. **Water.** 9, 1– 26.
- LIMA, MPR. 2006. **Variação espacial da macrofauna bentônica do Estuário da Bacia do Pina – Recife-PE.** Dissertação de Mestrado (Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- LINDSEY, BW; SMITH, FM; CROLL, RP. 2010. From inflation to flotation: Contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, 7, 85–96.
- LINS, JAPN; KIRSCHNIK, PG; DA SILVA QUEIROZ, V; CIRIO, SM. 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.** 8, 469-484.
- LIU, K; XIAO, X; ZHANG, D; DING, Y., LI, L; ZHAO, M. 2021. Quantitative estimates of organic carbon contributions to the river-estuary-marine system in the Jiaozhou Bay, China. **Ecol. Indic.** 129, 107929.
- LUO, XJ; CHEN, SJ; NI, HG; YU, M; MAI, BX. 2008. Tracing sewage pollution in the Pearl River Delta and its adjacent coastal area of South China Sea using linear alkylbenzenes (LABs). **Mar. Pollut. Bull.** 56, 158–162.
- MCCLELLAND, JW; VALIELA, I. 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. **Limnol. Oceanogr.** 43:577-585.
- MACÍAS-ZAMORA, JV; RAMÍREZ-ALVAREZ, N. 2004. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. **Environ. Pollut.** 130, 229-238.
- MACIEL, DC. 2015 **Avaliação da contaminação do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe através da tríade da qualidade do sedimento.** Tese de Doutorado (Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MACIEL, DC; COSTA, BVM; SANTOS, LPS; SOUZA, JRB; ZANARDI-LAMARDO, E. 2015a. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkmann Rocco (1973). **Trop. Oceanog. (Online)** 43, 26-37.
- MACIEL, DC; SOUZA, JRB; TANIGUCHI, S; BICEGO, MC; ZANARDI-LAMARDO, E. 2015b. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 101, 429-433.
- MACIEL, DC; SOUZA, JRB; TANIGUCHI, S; BÍCEGO, MC; SCHETTINI, CAF; ZANARDI-LAMARDO, E. 2016. Hydrocarbons in sediments along a tropical estuary-shelf transition area: Sources and spatial distribution. **Mar. Pollut. Bull.** 113, 566-571.
- MACIEL, DC; CASTRO, ÍB; DE SOUZA, JRB; YOGUI, GT; FILLMANN, G; ZANARDI-LAMARDO, E. 2018. Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. **Mar. Pollut. Bull.** 126, 473-478.
- MAGAM, SM; ZAKARIA, MP; HALIMOON, N; ARIS, AZ; KANNAN, N; MASOOD, N; LATIF, MT. 2016. Evaluation of distribution and sources of sewage molecular marker (LABs) in selected rivers and estuaries of Peninsular Malaysia. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 23, 5693-5704.
- MAHMOUD, TH. 1998. **Anionic detergents in the Red Sea coastal water in front of Hurgada, Egypt.** The Bulletin of the High Institute of Public Health. 28, 119–126.

- MAJORI, L; MORELLI, ML; RAUSA, G; DIANA, L. 1968. Recherches sur la pollution des eaux de mer dans le Golfe de Trieste. **Rev. Int. Océanogr. Méd.** 9, 83-98.
- MARIAPPAN, M; KARUPPASAMY, R. 2014. Acute toxicity effect of copper and cadmium in single and binary exposure on mortality rate and behavioural responses of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Inter. J. Curr. Res.** 6, 5906-5913.
- MARSON, M; TESOLIN, G; MATALLO, M; FRANCO, D; ALMEIDA, S; JONSSON, C; MOURA, M. 2013. **Mistura de herbicidas induz efeitos adversos em paulistinha (*Danio Rerio*)**. In: Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais. Campinas. Anais. Campinas: Instituto Biológico, 41p.
- MARTINS, CC; FERREIRA, JA; TANIGUCHI, S; MAHIQUES, MM; BICEGO, MC; MONTONE, R C. 2008. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 56, n. 7, p. 1359-1363.
- MARTINS, CC; BICEGO, MC; MAHIQUES, MM; FIGUEIRA, RCL; TESSLER, MG; MONTONE, RC. 2010. Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environ. Pollut.** 158, 3355-3364.
- MARTINS, CC; CABRAL, AC; CINTRA, SCTB; DAUNER, ALL; SOUZA, FM. 2014. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). **Environ. Pollut.** 188, 71–80.
- MASOOD N; ZAKARIA MP; HALIMOON N; ARIS AZ; MAGAM SM; KANNAN N; MUSTAFA S; ALI, MM; KESHAVARZIFARD M; VAEZZADEH V; ALKHADHER SAA; AL-ODAINI NA. 2016. Anthropogenic waste indicators (AWI) particularly PAHs and LABs in Malaysian sediments: application of aquatic environment for identifying anthropogenic pollution. **Mar. Pollut. Bull.** 102, 160-175.
- MCINTYRE, JK; DAVIS, JW; INCARDONA, JP; STARK, JD; ANULACION, BF; SCHOLZ, N. L. 2014. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. **Sci. Total Environ.** 500, 173–180.
- MEDEIROS, PM; BÍCEGO, MC. 2004a. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP—Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 49, 761-769.
- MEDEIROS, PM; BÍCEGO, MC. 2004b. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP—Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 49, 892–899.
- MEDEIROS, PM; BÍCEGO, MC; CASTELÃO, RM; Del ROSSO, C; FILLMANN, G; ZAMBONI, AJ. 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. **Environ. Int.** 31, 77–87.
- MEYERS, PA. 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. **Org. Geochem.** 27, 213 – 250.
- MIRANDA, L.B; CASTRO, B.M. de; KJERFVE, B., 2002. **Princípios de oceanografia física de estuários**. EDUSP, São Paulo, 1.
- MOMPELAT, S; BOT, BL; THOMAS, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environ. Int.** 35, p. 803-814.
- MONTUORI, P; TRIASSI, M. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons loads into the Mediterranean Sea: Estimate of Sarno River inputs. **Mar. Pollut. Bull.** 64, 512-520.
- MOOK, WG; TAN, FC. 1991. **Stable carbon isotopes in rivers and estuaries**. In Biogeochemistry of Major World Rivers, SCOPE 42, 245–264.
- MORRAL, SW; DUNPHY, JC; CANO, ML; EVANS, A; MCAVOY, DC; PRICE, BP; ECKHOFF, WS. 2006. Removal and environmental exposure of alcohol ethoxylates in US sewage treatment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 64, 3-13.
- MOSHER, M. 1992. **Organic Chemistry**. Sixth edition (Morrison, Robert Thornton; Boyd, Robert Neilson). Journal of Chemical Education, 69, A305.

- MOURA, JAS. 2016. **Poluentes orgânicos persistentes no sedimento do estuário do Capibaribe, Recife, Pernambuco**. Trabalho de Conclusão de Curso (Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MRDAKOVIĆ, M; ILIJIN, L; VLAHOVIĆ, M; MATIĆ, D; GAVRILOVIĆ, A; MRKONJA, A; PERIĆ-MATARUGA, V. 2016. Acetylcholinesterase (AChE) and heat shock proteins (Hsp70) of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae in response to long-term fluoranthene exposure. **Chemosphere** 159, 565-569.
- MUGRAY, AK; KUMAR, P. 2008. Anionic surfactants in treated sewage and sludges: Risk assessment to aquatic and terrestrial environmental. **Bioresour. Technol.** 99, 2919-2929.
- MULLER, EB; LIN, S; NISBET, RM. 2015. Quantitative adverse outcome pathway analysis of hatching in zebrafish with CuO nanoparticles. **Environ. Sci. Technol.** 49, 11817-11824.
- MUNGRAY, AK; KUMAR, P. 2009. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **Inter. Biodeter. Biodegradation** 63, 981-987.
- MUSTAPHA, DS; BAWA-ALLAH, KA. 2020. Differential toxicities of anionic and nonionic surfactants in fish. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 27, 16754-16762.
- NASCIMENTO, FCR; MUNIZ, K; FEITOSA, FAN; ARAÚJO, JP; SILVA, RMS; SILVA, GS; FLORES-MONTES, MJ. 2003. Disponibilidade nutricional da Baía do Pina e Rio Tejiú (Recife-PE- Brasil) em relação aos nutrientes e biomassa primária (setembro/2000). **Trop. Oceanog.** 31, 149-169.
- NIU, Z.G., ZHANG, K., ZHANG, Y., 2016. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the coastal area of the Bohai Bay, China. **Mar. Pollut. Bull.** 107, 245-250.
- NKPONDION, NN; UGWUMBA, OA; ESENOWO, IK. 2016. The toxicity effect of detergent on enzymatic and protein activities of African mud catfish (*Clarias gariepinus*). **J. Environ. Anal. Toxicol.** 6, 2161-0525.
- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2022. Estuarine tutorial. Available at: https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial_estuaries/welcome.html. Accessed date: 19 August 2022.
- NORIEGA, CED; ARAUJO, M; LEFEVRE, N. 2013. Spatial and temporal variability of the CO₂ fluxes in a tropical, highly urbanized estuary. **Estuaries and Coasts** 36, 1054-1072.
- NORIEGA, C; ARAUJO, M; LEFÈVRE, N; MONTES, MF; GASPAS, F; VELEDA, D. 2015. Spatial and temporal variability of CO₂ fluxes in tropical estuarine systems near areas of high population density in Brazil. **Reg. Environ. Chang.** 15, 619-630.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2002. **Dodecylbenzene and undecylbenzene (isomers Benzenes, C10-C16 alkyl derivative)**. Geneva: UNEP, 79p.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2013. **Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test**. OECD guidelines for the testing of chemicals, Paris, France.
- OKBAH, MA; IBRAHIM, AMA; GAMAL, MNM. 2013. Environmental monitoring of linear alkylbenzene sulfonates and physicochemical characteristics of seawater in El-Mex Bay (Alexandria, Egypt). **Environ. Monit. Assess.** 185, 3103-3115.
- OLIVEIRA, TS; BARCELLOS, RL; SCHETTINI, CAF; CAMARGO, PB. 2014a. Processo sedimentar atual e distribuição da matéria orgânica em um complexo estuarino tropical, Recife, PE, Brasil. **J. Integr. Coast.** 14, 399-412.
- OLIVEIRA, DD; SOUZA-SANTOS, LP; SILVA, HKP; MACEDO, SJ. 2014b. Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 104, 373-378.
- PAINTER HA; ZABEL T, 1989. The behavior of LAS in sewage treatment. **Tenside Surf Det.** 26, 108-115.
- PARANAGUÁ, MN; NEUMANN-LEITÃO, S; NOGUEIRA-PARANHOS, JD; SILVA, TA; MATSUMURA-TUNDISI, T. 2005. Cladocerans (Branchiopoda) of a tropical estuary in Brazil. **Braz. J. Biol.** 65, 107-115.
- PARDAL, EC; XAVIER, D.A.; VILELA, I; DE CAMARGO, PB; FLORES-MONTES, M.J.; BARCELLOS, RL. 2019. Variabilidade sedimentológica e geoquímica em um sistema estuarino tropical sob forte influência antrópica (Rio Capibaribe-PE). **Pesquisas em Geociências** 46, e0852-e0852.

- PARNELL AC; INGER R; BEARHOP S; JACKSON A. 2008. SIAR: stable isotope analysis in R. Available at: <http://cran.rproject.org/web/packages/siar/index.html>. Accessed date: 15 January 2021.
- PASCHOAL, JAR; RATH, S; AIROLDI, FPDS; REYES, FG. 2008. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quím. Nova** 31, 1190-1198.
- PAYNE, JF; MATHIEU, A; COLLIER, TK. 2003. Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. In: DOUBEN, P. E. T. (Ed.). **PAHs : an ecotoxicological perspective** England: John Wiley & Sons Ltd, 191-224.
- PCR (Prefeitura da Cidade do Recife). 2005. Atlas de desenvolvimento humano na cidade de Recife. Available at: <http://www.condepefidem.pe.gov.br/web/condepe-fidem/atlas-metropolitano>. Accessed date: 20 February 2021.
- PENTEADO, JCP; EL SEOUD, OA; CARVALHO, LRF, 2006. Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica, **Quím. Nova** 29, 1038-1046.
- PERALES JA;MANZANO; MA; SALES, D; QUIROGA JM. 1999. Linear bAlkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. **Bull. Environ. Contam.Toxicol.** 63, 94-100.
- PETERS, KE; WALTERS, CC; MOLDOWAN, JM. 2005. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History**. Cambridge University Press, p. 471.
- PHILP, RP. 1985 **Fossil fuel biomarkers: Applications and spectra**. Elsevier Science Ltd, New York, NY. 1985, 306 p.
- PISANI, O; OROS, DR; OYO-ITA, OE; EKPO, BO; JAFFÉ, R; SIMONEIT, BRT. 2013. Biomarkers in surface sediments from the Cross River and estuary system, SE Nigeria: assessment of organic matter sources of natural and anthropogenic origins. **Appl. Geochem.** 31, p. 239-250.
- PORTO DO RECIFE. **Porto do Recife**. Disponível em<http://www.portodorecife.pe.gov.br/porto_cidade.php>. Acesso em: 30/03/2019.
- PRATS D, LÓPEZ C, VALLEJO D, VARÓ P, LEÓN VM. 2006. Effect of temperature on the biodegradation of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) and alcohol ethoxylate (AE).**J. Surfactant Deterg.** 9, 69–75.
- PRITCHARD, DW. 1967. **What is an estuary: physical point of view**. In: Lauff, G. H. ed. Am. Ass. Advnt. Sci. 83, p. 3-5.
- PROBIEA (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira /Educação ambiental). 2011. **Guia de ambientes costeiros e marinhos**. Instituto de ciências Biológicas – Universidade de Brasília (UNB), Brasília, DF.
- PULIDINDI, K.; PANDEY, H., 2017. **Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) Market Size By Application (Dish Washing Liquids, Household Detergents & Cleaners, Industrial Cleaners, Personal Care Products), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Spain, Italy, China, India, Japan, Australia, Indonesia, Malaysia, Brazil, Mexico, South Africa, GCC), Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2024. [S.I.]**. Available from: <https://www.gminsights.com/industryanalysis/linear-alkylbenzene-sulfonate-LAS-market>. Accessed date: 12 December 2022.
- QUEVAUVILLER, PH; COFINO, W; VIJVERBERG, A; WELLS, DE; GRIEPINK, B. 1992. **Quality assurance in marine monitoring**. Proceedings of the Workshop Held in Noordwijkerhout. 21–23, p. 43.
- RAMSDORF, WA. 2011. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**.
- RAMPRASAD, C; PHILIP; L. 2016. Surfactants and personal care products removal in pilot scale horizontal and vertical flow constructed wetlands while treating greywater. **Chem. Eng. J.** 284, 458-468.
- RAND, GM. 1995. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC press.
- RAYMUNDO, C; PRESTON, M. 1992.The distribution of linear alkylbenzenes in coastal and estuarine sediments of the Western North Sea. **Mar. Pollut. Bull.** 24, 138–146.

- RÉGIS, CG; SOUZA-SANTOS, LP; YOGUI, GT; MORAES, AS; SCHETTINI, CAF. 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 137, 45-55.
- RIBANI, M; BOTTOLI, CBG; COLLINS, CH; JARDIM, ICSF; MELO, LFC. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. nova** 27, 771-780.
- RIBELLES, A; CARRASCO, C; ROSETY, M; ALDANA M. 1995a. A histochemical study of the biological effects of Sodium Dodecyl Sulphate on the intestine of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Environ. Saf.** 32, 131-138.
- RIBELLES, A; CARRASCO, C; ROSETY, M; ALDANA M. 1995b. Morphological and histochemical changes on the liver and pancreas of gilthead, *Sparus aurata* L, induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate. **Histol. Histopathol.** 10, 781- 787.
- RICHARDSON, S.D., TERNES, TA. 2005. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v.77, n.12, p.3807-3838.
- RITZ, C; BATY, F; STREIBIG, JC; GERHARD, D. 2015. Dose-response analysis using R *PloS one* 10: e0146021.
- RANA, T; BERA, AK; DAS, S; BHATTACHARYA, D; BANDYOPADHYAY, S; PAN, D; DAS, SK. 2010. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on blood oxidative stress indices in cattle in an arsenic-affected zone. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 1327-1332.
- RINAWATI; KOIKE, T; KOIKE, H; KURUMISAWA, R; ITO, M; SAKURAI, S; TOGO, A; SAHA, M; ARIFINC, Z; TAKADA, H. 2012. Distribution, source identification, and historical trends of organic micro pollutants in coastal sediment in Jakarta Bay, Indonesia. **J. Hazard. Mater.** 217-218, 208-216.
- ROBINSON, HE; STRICKLER, JR; HENDERSON, MJ; HARTLINE, DK.; LENZ, PH. 2019. Predation strategies of larval clownfish capturing evasive copepod prey. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 614, 125-146.
- ROGERS, KM. 2003. Stable carbon and nitrogen isotope signatures indicate recovery of marine biota from sewage pollution at Moa Point, New Zealand. **Mar. Pollut. Bull.** 46, 821-827.
- ROMANELLI, MF; MORAES, MCF; VILLAVICENCIO, ALCH; BORRELY, SI. 2004. Evaluation of toxicity reduction of sodium dodecyl sulfate submitted to electron beam radiation. **Radiat. Phys. Chem.** 71, 411-413.
- ROSETY, M; RIBELLES, A; CARRASCO, C. 1997. A morphological study in the kidney and spleen of gilthead, *Sparus aurata* L., caused by sodium dodecyl sulphate. **Histol. Histopathol.** 12, 925-929.
- ROSETY, M; RIBELLES, A; ROSETY-RODRIGUEZ, M; CARRASCO, C; ORDONEZ, F.J; ROSETY, JM; ROSETY PLAZA, M. 2000. Morpho-histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulphate on the digestive gland of the Portuguese oyster. **Histol. Histopathol.** 15, 1137-1143.
- ROSETY, M; ORDONEZ FJ; ROSETY-RODRIGUEZ, M; ROSETY, JM; ROSETY, I; CARRASCO, C; RIBELLES A. 2001. Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS) and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. **Histol. Histopathol.** 16, 839-843.
- ROSETY, M; ORDONEZ, FJ; ROSETY-RODRIGUEZ, M; ROSETY, JM; ROSETY, I. 2003. In vitro acute toxicity of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the motility of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. **Histol. Histopathol.** 18, 475-478.
- SAMSON, JC; GOODRIDGE, R; OLOBATUYI, F; WEIS, JS. 2001. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). **Aquat. Toxicol.** 51, 369-376.
- SANDBACKA, M; CHRISTIANSON, I; ISOMAA, B. 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish—a comparative study. **Toxicology in vitro** 14, 61-68.
- SANTIAGO, MF; SILVA-CUNHA, MGG; NEUMANN-LEITAO, S; COSTA, KMP; PALMEIRA, GCB; NETO, FFP; NUNES, FS. 2010. Phytoplankton dynamics in a highly eutrophic estuary in tropical Brazil. **Braz. J. Oceanog.** 58, 189-205.

SANTOS, GT; BEZERRA-JUNIOR, JL; COSTA, KMP; FEITOSA, FAN. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia Do Pina, Recife, PE). **REPESCA**, v.4, n.1, p.95-109.

SASAKI, ST. 2012. **Marcadores orgânicos moleculares como ferramentas no monitoramento ambiental: Avaliação da distribuição de Alquilbenzeno Lineares (LABs) em organismos e sedimentos, como indicativo de exposição ao esgoto em áreas costeiras**. Tese de Doutorado (Oceanografia) Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHETTINI, CA. 2002. Caracterização física do estuário do rio Itajaí-açu, SC. **Rev. Bras. Recur. Híd.** 7, 123-142.

SCHETTINI, CAF; MIRANDA, JBD; VALLE-LEVINSON, A; TRUCCOLO, EC; DOMINGUES, EC, 2016a. The circulation of the lower Capibaribe estuary (Brazil) and its implications for the transport of scalars. **Braz. J. Oceanogr.** 64, 263-276.

SCHETTINI, CAF; PAIVA, BP; BATISTA, RAL.; FILHO, JCO; TRUCCOLO, EC. 2016b. Observation of the Estuarine Maximum Turbidity Zone in the Highly Impacted Capibaribe Estuary, **Brazil. Braz. J. Oceanogr.** 64, 83-87.

SCHIEBEL, J. 2004. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. **J. Surfactants Deterg.** 7, 319-328

SCHNEIDER, B; SCHLITZER, R; FISCHER, G; NOTHING, E-M. 2003. Depth-dependent elemental compositions of particulate organic matter (POM) in the ocean. **Glob. Biogeochem. Cycles** 17, 1032.

SCOTT, MJ; JONES, MN. 2000. **The biodegradation of surfactants in the environment**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1508, 235-251.

SCOTT, GR; SLOMAN, KA; ROULEAU, C; WOOD, C. M. 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.** 206, 1779-1790.

SIEBEL, A; BONAN, C; SILVA, RD. 2015. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 15-56.

SHCHERBAKOVA, VA; LAURINAVICHUS, KS; AKIMENKO, VK. 1999. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. **Chemosphere** 39, 1861-1870.

SILVA, TR; LOPES, SRP; SPORL, G; KNOPPERS, B. A.; AZEVEDO, DA, 2013. Evaluation of anthropogenic inputs of hydrocarbons in sediment cores from a tropical Brazilian estuarine system. **Microchem. J.** 109, 178-188.

SILVA, H. K. P. 2015. Concentrações de metais pesados nos sedimentos do estuário do Rio Capibaribe, na Região Metropolitana do Recife (RMR) – Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado (Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVEIRA, MAV; PEREIRA, N; TOMMASI, LR. 1982. Resultados preliminares sobre os teores de detergentes aniônicos na Baía e Estuário de Santos. **Bolm Inst. oceanogr.** 31, 95-99.

SIMONETTI, RB. 2014. **Zebrafish (Danio rerio): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica**.

SIQUEIRA, GW.; BRAGA, ES.; MAHÍQUES, MM.; APRILE, FM. 2006. Determinação da Matéria Orgânica e Razões C / N e C / S em Sedimentos de Fundo do Estuário de Santos - SP / Brasil. **ACMar** 39, 18-27.

SMALL, C; NICHOLLS, RJ, 2003. A global analysis of human settlement in coastal zones. **J. Coastal Res.** 584-599.

SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento). 2019. Available in: <http://tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/esgoto>. Accessed in: 06 February 2022.

SNIS (SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL), 2021. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto**. Brasília: MCIDADES, SNSA, 2020., p. 91.

- SODRÉ, FF; LOCATELLI, MAF; JARDIM, WF. 2010. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water Air Soil Pollut.** 206, 57-67.
- SOMERFIELD, PJ; FONSECA-GENEVOIS, VG; RODRIGUES, ACL; CASTRO, FJV; SANTOS, GAP. 2003. Factors affecting meiofauna community, structure in the Pina Basin, an urbanized embayment on the coast of Pernambuco, Brazil. **J. Mar. Biolog. Assoc.** 83, 1209–1213.
- SOPHONSIRI, C; MORGENROTH, E. 2004. Chemical composition associated with different particle size fractions in municipal, industrial, and agricultural wastewaters. **Chemosphere** 5, 691–703.
- SOUZA, LFCD. 2009. **Avaliação da degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbicos.** Dissertação de Mestrado (Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SPENSE, R; GERLACH, G; LAWRENCE, C; SMITH, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews** 83, 13-34.
- STRICKLAND, JDH; PARSONS, TR. 1972. **A practical handbook of seawater analysis.** 2.ed. Ottawa, Bulletin Fisheries Research Board of Canada. 167p.
- SUSMI, TS; REBELLO, S; JISHA, MS; SHERIEF, PM. 2010. Toxic effects of sodium dodecyl sulfate on grass carp *Ctenopharyngodon Idella*. **Fish Technol.** 47, 157–162.
- TAKADA, H; ISHIWATARI, R. 1990. Biodegradation experiments of linear alkylbenzenes (LABs): isomeric composition of C12 LABs as an Indicator of the degree of LAB degradation in the aquatic environment. **Environ. Sci. Technol.** 24, 86–91.
- TAKADA, H.; EGANHOUSE, R. P., 1998. **Molecular markers of anthropogenic waste.** In: Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation; Meyers, R. A., Ed. John Wiley e Sons; New York, p. 2883-2940.
- TAKADA, H; ISOBE, KO; ZAARIA, MP; CHIEM, NH; MINH, LY; PRUDENT, M; BOONYATUMANOND, R; SAHA, M; SARKAR, S. 2004. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Res.** 38, 2449-2459.
- TAZIOLI, A; TAZIOLI, GS. 2005. Landfill contamination problems: a general perspective and engineering geology aspects. **G. Geol. Appl.** 1, 203-211.
- THORNTON, SF; MCMANUS, J. 1994 Application of organic carbon and nitrogen stable isotope and C/N ratios as source indicators of organic matter provenance in estuarine systems: evidence from the Tay Estuary, Scotland. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 38, 219-233.
- THURMAN, HV. 1999. **Essentials of Oceanography.** Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. p. 527.
- TORREIRO-MELO, AGA; SILVA, JS; BIANCHINI, A; ZANARDI-LAMARDO, E; DE CARVALHO, PSM. 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere** 132, 17-23.
- TRAVASSOS, PEPF; MACEDO, SJ; KOENING, ML. 1991. Aspectos hidrológicos do estuário do rio Capibaribe (Recife- PE- Brasil). **Trabalhos Oceanográficos**, Recife, 22, 9-38.
- TSUTSUMI, S; YAMAGUCHI, Y; NISHIDA, I, AKIYAMA, K., ZAKARIA, M.P., TAKADA, H., 2002. Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact. **Mar. Pollut. Bull.** 45 , 325–331.
- TUHOLSKE, C; HALPERN, BS; BLASCO, G; VILLASENOR, JC; FRAZIER, M; CAYLOR, K. 2021. **Mapping global inputs and impacts from of human sewage in coastal ecosystems.** PloS one16, e0258898.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 1992. **Determinations of Petroleum Hydrocarbons in Sediments.** In: Reference Methods for Marine Pollution Studies, 20, p.78.
- VALENÇA, APMC. 2009. As comunidades macrobentônicas na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco. **Trop. Oceanog.** 37, 80-99.
- VAN DE PLASSCHE, EJ; BRUJIN, JHM; STEPHENSON, RR; MARSHALL, SJ; FEIJTEL, TCJ; BELANGER, SE. 1999. Predicted no-effect concentrations and risk characterization of four surfactants: linear alkyl benzene sulfonate alcohol ethoxylates, alcohol ethoxylates sulfates, and soap. **Environ. Toxicol. Chem.** 18, 2653–2663.

- VARSHA, J; MISHRA, K.; GOVIND, P. 2013. Effects of linear alkyl benzene sulfonate on the liver tissues of *Puntius ticto* fish. **Inter. J. Chem. Lif. Sci.** 2, 1068-1070.
- VAUGHAN, M; VAN EGMOND, R. 2010. The use of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo for the acute toxicity testing of surfactants, as a possible alternative to the acute fish test. **Altern. Lab. Anim.** 38, 231-238.
- VENKATESAN, MI; NORTHRUP, T; PHILLIPS, CR. 2002. Determination of linear alkylbenzenes in fish tissue by gel permeation chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A** 942, 223-230.
- VENHUIS, SH; MEHRVAR, M. 2004. Health effects, environmental impacts, and photochemical degradation of selected surfactants in water. **Inter. J. Photoenergy** 6, 115-125.
- VERGE, C; MORENO, A; BRAVO, J; BERNA, JL. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Chemosphere** 44, 1749-1757.
- VERSTEEG, DJ; RAWLINGS, J.M. 2003. Bioconcentration and toxicity of dodecylbenzene sulfonate (C 12 LAS) to aquatic organisms exposed in experimental streams. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 44, 0237-0246.
- WALTER, WG. 1961. **Standard methods for the examination of water and wastewater.**
- WANG, JZ; ZHANG, K.; LIANG, B. 2012. Tracing urban sewage pollution in Chaohu Lake (China) using linear alkylbenzenes (LABs) as a molecular marker. **Sci. Total Environ.** 414, 356-363.
- WANG, Y; ZHANG, Y; LI, X; SUN, M; WEI, Z; WANG, Y; FENG, X. 2015. Exploring the effects of different types of surfactants on zebrafish embryos and larvae. **Sci. Rep.** 5, 10107.
- WATERS, J; FEIJTEL, TCJ. 1995. AIS/CESIO – Environmental surfactant monitoring programme: outcome of five national pilot studies on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Chemosphere** 30, 1939-1956.
- WEAR, SL; ACUÑA V; MCDONALD R; FONT, C. 2021. Sewage pollution, declining ecosystem health, and cross-sector collaboration. **Biol. Conserv.** 255, 109010.
- WEI, GL; LIU, LY; BAO, LJ; ZENG, EY. 2014. Tracking anthropogenic influences on the continental shelf of China with sedimentary linear alkylbenzenes (LABs). **Mar. Pollut. Bull.** 80, 80-87.
- WHELAN, MJ; VAN EGMOND, R; GUYMER, I; LACOURSIÈRE, JO; VOUGHT, LMB; FINNEGAN, C; PEARSON, JM. 2007. The behaviour of linear alkyl benzene sulphonate under direct discharge conditions in Vientiane, Lao PDR. **Water Res.** 41, 4730-4740.
- WINATA, CL; KORZH, S; KONDRYCHYN, I; KORZH, V; GONG, Z. 2010. The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. **BMC Dev. Biol.** 10, 1-9.
- WU, H; DING, S. 2016. Micronuclei and dyskaryosis of erythrocytes and oxidative stress response with endosulfan exposure in topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 134, 179-185.
- XAVIER, DA; SCHETTINI, CA; FRANÇA, EJ; FIGUEIRA, RC; BARCELLOS RL. 2017. Determination of geochemical background values on a tropical estuarine system in a densely urban area. Case study: Capibaribe estuary, Northeastern Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 123, 381-386.
- YANG, Y; QI, S; CHEN, J; LIU, Y; TENG, M; WANG, C. 2016. Toxic effects of bromothalonil and flutolanil on multiple developmental stages in zebrafish. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 97, 91-97.
- YANG, C.; SONG, G.; LIM, W. 2020. A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.** 237, 108840.
- ZAGATTO, PA; BERTOLETTI, E. 2008. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos: RiMa, 486 p.
- ZANARDI-LAMARDO, E; BÍCEGO, MC; CASTRO, BM; MIRANDA, LB; PRÓSPERI, VA. 2000. Southern Brazil. In: Sheppard, C. (Org). **Seas at Millennium: An Environmental Evaluation.** Elsevier Science. 1, 731-747.
- ZANARDI-LAMARDO, E; NÓBREGA, ASC; SANTOS, RHA; MACIEL, DC. 2016. Fontes e níveis de contaminação do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). **Trop. Oceanog. (Online)** 44, 118-131.

ZENG, EY; KHAN, AR; TRAN, K. 1997. Organic pollutants in the coastal marine environment off San Diego, California. 3. Using linear alkylbenzenes to trace sewage-derived organic materials. **Environ. Sci Technol.** 16, 196–201.

ZHANG, K; WANG, JZ; LIANG, B; SHEN, RL; ZENG, EY. 2012. Assessment of aquatic wastewater pollution in a highly industrialized zone with sediment linear alkylbenzenes. **Environ Toxicol. Chem.** 31, 724–730.

ZHANG, C; LU, J; WU, J. 2019. Adsorptive removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by detritus of green tide algae deposited in coastal sediment. **Sci. Total Environ.** 670, 320–327.

ZIMMERMAN, AR; CANUEL, EA. 2001. Bulk organic matter and lipid biomarker composition of Chesapeake Bay surficial sediments as indicators of environmental processes. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 53, 319–341.