



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



Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro

Padronização e aplicação do copépodo marinho
bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste
em avaliações toxicológicas de sedimentos
estuarinos

Orientadora: Dra. Lília Pereira de Souza Santos

Recife
2008

Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro

Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico
Tisbe biminiensis como organismo-teste em avaliações
toxicológicas de sedimentos estuarinos

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

Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

Recife
2008

C355p

Castro, Cristiane Maria Varela de Araújo de

Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos / Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro. – Recife: O Autor, 2008.

xv, 104 f.; il., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2008.

Inclui Referências bibliográficas.

1. Oceanografia. 2. Ecotoxicologia. 3. Porto de Suape. 4. *Tisbe biminiensis*. 5. Baía de Todos os Santos. 6. *Litopenaeus Vannamei*. 7. Sedimento. 8. HPA. 9. Metais Pesados. I. Título.

UFPE

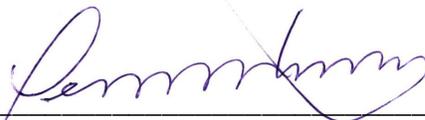
Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos

Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora:



Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos
(Orientadora e Presidente da Banca)



Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
(Universidade Estadual Paulista)



Prof. Dr. Mario Takayuki Kato
(Universidade Federal de Pernambuco)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho
(Universidade Federal de Pernambuco)



Profa. Dra. Carmen Medeiros Limongi
(Universidade Federal de Pernambuco)

“O fator decisivo para vencer um
obstáculo é, invariavelmente,
ultrapassar o obstáculo anterior.”

Henry Ford

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu filho Gustavo,
pessoinha que sempre me fez sentir
com super poderes, e ao meu marido,
Ivan, que sempre acreditou em mim
muito mais do que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

Nem sei como começar... Bom, foram 56 meses da minha vida com muitos momentos felizes e também desesperados, grandes amizades que se solidificaram e outras conquistadas, conhecimentos adquiridos e muitos cabelos brancos, enfim...

Quero inicialmente agradecer a minha orientadora, Dra. Lília P. de Souza-Santos, que eu acuso como a principal responsável pela minha formação de pesquisadora, muito obrigada pelos 7 anos de convivência e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, palco do desenrolar desta tese.

Ao CNPq por ter concedido minha bolsa de doutorado.

À PETROBRÁS, RECUPETRO (Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas contaminadas por Atividades Petrolíferas) e RELINE (Sub-Rede Resíduos Líquidos do Nordeste) pelo financiamento desta tese.

Ao Prof. Renato Carreira pelas análises de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos do Porto de Suape.

Ao Prof. Carlos Rezende pelas análises de metais pesados do Porto de Suape.

À empresa Aqualider por ceder as pós-larvas e também a água do mar.

Ao Prof. Dr. Paulo Santos e ao amigo David pela ajuda nas primeiras coletas em Suape.

À Dra. Monica Costa por ter iniciado esse caminho na toxicologia comigo, que pena que não pôde ir mais a frente.

Às duas mulheres que sempre foram exemplo de garra na minha vida, minha mãe Delmarineide e minha avó Marinalva (que não está entre nós, mas acredito que ainda torce por mim). Ao meu irmão (Lucas) pelas horas de descontração e dor de cabeça que me deu, que essa minha caminhada seja exemplo para a sua vida.

Ao meu filho e meu marido que suportaram minhas ausências, mal humor e estresse, com certeza sem o apoio e fé que vocês têm em mim essa tese não teria sido possível.

Agradeço também a Sarah (sogra), Vanildo (sogro), Nilson (cunhado) e Fabiane (cunhada) família que me acolheu e me apoiou em todos os momentos.

E agora, e com certeza não menos importantes, aos meus amigos...

Do LACE Aurelyana (Lela), Anny Gabrielle (Gabt), Deloar, Lílian Cristine, Rodolfo e mais recentemente Bruno, Nancilda (Nana) e Kalyne, por todos os momentos juntos (que não foram poucos) sejam de descontração, de troca de conhecimento e algumas broncas também. Em especial as minhas duas cobaias, Deloar e Gaby, que muito tiveram a ver com essa tese e tenho certeza que eu aprendi muito mais com vocês do que ensinei.

As amigas Christina, Priscila, Maristela, Carla, Anita, Juliana e Karine, e ao amigo Nilson seja pela ajuda na tese e/ou principalmente pela amizade a mim oferecida, com certeza levarei vocês comigo sempre.

Bom a todos os meus amigos do Depto. de Oceanografia, do Lab. de Bentos (Adilma, Thiago e Natália), a todos os técnicos e funcionários que me ajudaram de alguma forma.

E a todas as pessoas que passaram no meu caminho e foram facilitadores nesta minha caminhada.

Enfim, a Deus por ter me concedido a graça de ter terminado esta tese e por ter colocado todas essas pessoas em meu convívio.

Muito Obrigada a todos.

LISTA DE TABELAS

Table 1	Experimental conditions of the tests undertaken using the <i>Tisbe biminiensis</i> .	17
Table 2	Metal concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) estimated in the sediment samples of Maracaípe estuary collected on March 2007 compared to effects-range sediment guidelines by NOAA and Long <i>et al.</i> (1995).	19
Table 3	Mean LC50 (\pm standard deviation) and coefficient of variation (CV) in different period (48, 72 and 96h) of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and Cr for <i>Tisbe biminiensis</i> . n = 12	21
Table 4	Median lethal concentrations (LC50) of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and Cr obtained with <i>Tisbe biminiensis</i> and others organisms.	22
Tab. 5.1	Concentração de material orgânico (M.O. em %) e análise de granulometria dos sedimentos amostrados na Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco) e junho (período chuvoso) do ano de 2003.	40
Tab. 5.2	Concentração dos metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) encontrados nas amostras de sediment da Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por os) e junho (período chuvoso representado por pc) do ano de 2003 e os limites para metais em sedimentos descritos por Long <i>et al.</i> (1995).	41
Tab. 5.3	Concentrações mínimas e máximas de metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) encontradas nos sedimentos da Baía de Suape e em outros locais.	42
Tab. 5.4	Concentrações de HPAs (ng.g^{-1} peso seco) na fração total das amostras de sedimento ($< 2000 \mu\text{m}$) da Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por os) e junho (período chuvoso representado por os) de 2003 e os limites para metais em sedimentos descritos por Long <i>et al.</i> (1995).	44
Tab. 5.5	Concentrações mínimas e máximas de HPA total, hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) e MCNR encontradas em sedimentos coletados na Baía de Suape e em outros locais.	45
Tab. 5.6	Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e parâmetros relacionados com amostras de sedimento total ($< 2000 \mu\text{m}$) para a Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por ps) e junho (período chuvoso representado por pc) coletados no ano de 2003.	47

Tab. 6.1	Valores de pH, oxigênio dissolvido (OD), salinidade e temperatura da água, medidos em cada ponto de coleta do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca no período de abril de 2005 a janeiro de 2006.	60
Tab. 6.2	Média (\pm desvio padrão) da sobrevivência de <i>Tisbe biminiensis</i> ao final de uma semana quando exposto ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006.	62
Tab. 6.3	Média (\pm desvio padrão) da fecundidade de <i>Tisbe biminiensis</i> ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.	62
Tab. 6.4	Número médio (\pm desvio padrão) de náuplios de <i>Tisbe biminiensis</i> ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.	63
Tab. 6.5	Número médio (\pm desvio padrão) de copepoditos de <i>Tisbe biminiensis</i> ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.	63
Tab. 6.6	Concentração média de metais, matéria orgânica (M.O.) e percentuais médios de cascalho, areia e silte+argila dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco e chuvoso no ano de 2005/2006.	64
Tab. 6.7	Valores médios de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) encontrados nos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco e chuvoso do ano de 2005/2006 e no estuário do rio Maracaípe.	65
Tab. 6.8	Valores médios de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) (ng.g^{-1} peso seco) encontrados nos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco e chuvoso do ano de 2005/2006 e no estuário do rio Maracaípe.	66
Tab. 6.9	Índices característicos para avaliar a origem, petrogênica ou pirolítica, dos HPAs (FEN = fenantreno; ANT = antraceno; FLT = fluoranteno; PIR	68

= pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; CRI = criseno).

Tab 6.10	Sensibilidade de espécies de copépodos a diferentes poluentes.	70
Tab. 7.1	Coordenadas geográficas dos pontos de coleta e valores de pH, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade obtidos no estuário do Rio São Paulo (BTS) nos meses de março e outubro de 2006.	79
Tab. 7.2	Médias (\pm desvio padrão) do ganho de peso (mg de peso seco) e crescimento (mm) do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> quando exposto aos sedimentos do estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE) em março e outubro de 2006.	84
Tab. 7.3	Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em amostras de sedimento total do estuário do Rio São Paulo durante os meses de abril e outubro de 2006.	87
Tab. 7.4	Concentrações de HPA (ng g^{-1} de peso seco) em amostras de sedimento total do estuário do Rio São Paulo durante os meses de abril e outubro de 2006.	88
Tab. 7.5	Resultado da análise de Correlação de Pearson (r , R^2 e p) entre os bioensaios com o copépodo <i>Tisbe biminiensis</i> e a PL de <i>Litopenaeus vannamei</i> e os principais compostos dos HPA e alifáticos.	89

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Mortality and fecundity (means \pm 1 SD) of *Tisbe biminiensis* 19 females exposed to the control sediment and in seawater for 7 days. n=5.
- Fig. 2 Mean nauplii number, copepodite number and fecundity of *Tisbe biminiensis* 20 obtained with different grain sizes (GR0 = only seawater; GR1 = less than 63 μ m; GR2 = greater than 63 μ m and less than 125 μ m; GR3 = greater than 125 μ m and less than 250 μ m; and GR4 = greater than 250 μ m and less than 2 mm).
- Fig. 5.1 Mapa adaptado de FADE (2006) com a localização do Porto de 31 Suape, que se encontra na região Nordeste do Brasil no estado de Pernambuco, onde foram determinados cinco pontos de coleta (1 – 8°21'22.2"S and 34°57'17.6"W; 2 – 8°23'04.9"S and 34°57'24.6"W; 3 – 8°23'22.2"S and 34°57'52.1"W; 4 – 8°22'54.1"S and 34°58'06.2"W; and 5 – 8°21'42.7"S and 34°57'56.4"W).
- Fig. 5.2 Sobrevivência (a) e fecundidade (b) de fêmeas de *Tisbe biminiensis* 36 expostas aos sedimentos da Baía de Suape amostrados durante o período seco (February 2003) e sedimento controle (Maracáipe/PE). Ind.7 dias⁻¹: número médio de descendentes produzidos durante 7 dias; valores expressos em média \pm 1 desvio padrão. * significa diferenças significativas em relação ao controle pelo teste de Tukey.
- Fig. 5.3 Sobrevivência (a) e fecundidade (b) de fêmeas de *Tisbe biminiensis* 37 expostas aos sedimentos da Baía de Suape amostrados durante o período chuvoso (Junho 2003) e sedimento controle (Maracáipe/PE). Ind.7 dias⁻¹: número médio de descendentes produzidos durante 7 dias; valores expressos em média \pm 1 desvio padrão. * significa diferenças significativas em relação ao controle pelo teste de Tukey.
- Fig. 5.4 Concentrações dos n-Alcanos (n-C₁₂ a n-C₃₄), pristano e fitano nos 48 sedimentos coletados na Baía de Suape nas estações 1, 2, 3, 4 e 5 nos meses de fevereiro (período seco) (□) e junho (período chuvoso) (■) no ano de 2003.
- Fig. 6.1 Mapa adaptado de FADE (2006) com a área estudada e os pontos 56 de coleta nas áreas do Porto Interno de Suape e no estuário do rio

Ipojuca, ambos localizados no Complexo Industrial Portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. 1 – cais de atracação do Porto de Suape, 2 – próximo a ilha Cocaia, 3 – na desembocadura do rio Tatuoca, 4 – na desembocadura do rio Massangana, 5 – em frente a termelétrica de Pernambuco, 6 – próximo a desembocadura do rio Merepe, 7 – rio Ipojuca, 8 – rio Ipojuca e 9 – rio Merepe.

- Fig. 6.2 Efeitos letal e subletal dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos meses de abril (A), julho/Agosto (B), outubro (C) e janeiro (D) utilizando como organismo teste o copépodo *Tisbe biminiensis*. A cor verde significa que não houve efeito tóxico, e a cor vermelha significa que houve efeito tóxico em relação ao controle. 61
- Fig 7.1 Mapa com a localização dos pontos dos quatro pontos de coleta no estuário do Rio São Paulo, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. 78
- Fig. 7.2 Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e número de copepoditos (d) de *Tisbe biminiensis* expostos aos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE) nos meses de março e outubro de 2006. * representa diferença significativa em relação ao controle, de acordo com o teste de Tukey. 85
- Fig. 7.3 Médias (\pm desvio padrão) de sobrevivência (a), crescimento (b) e ganho de peso (c) das pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* expostas aos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE), coletados em março e outubro de 2006. 86

PRINCIPAIS SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS NO TEXTO

Bgd	Background
CIPS	Complexo Industrial Portuário de Suape
CL ₅₀	Concentração Letal que mata 50% dos organismos ou LC ₅₀ (Lethal Concentration)
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
EPA	Environmental Protection Agency
ERL	Effect Range-Low
ERM	Effect Range-Median
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HRP	Hidrocarboneto Resolvido de Petróleo
HTP	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
ISO	International Organization for Standardization
MCNR	Mistura Complexa Não Resolvida
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PCBs	Bifenilas Poli-Cloradas
PEL	Probable Effect Level
Ph	Fitano
PL	Pós-Larva
Pr	Pristano
<i>r</i>	Taxa de crescimento populacional
SD	Standard Deviation
TIE	Toxicity Identification Evaluation
SQGs	Sediment Quality Guidelines
TEL	Threshold Effect Level
TIE	Toxicity Identification Evaluation
Σn -alk	Somatório dos n-alcanos
$\Sigma(C_{14}-C_{20})$	Somatório dos n-alcanos de cadeia curta
$\Sigma(C_{21}-C_{34})$	Somatório dos n-alcanos de cadeia longa

RESUMO

As áreas costeiras sofrem com a grande quantidade de poluentes que chegam pelos rios. Esses poluentes, por sua vez, tendem a se acumular no sedimento, que desta forma tornam-se tóxico tanto para os organismos que o utilizam como habitat quanto para os que dependem deste ambiente para sua alimentação. Os poluentes podem tornar-se disponíveis para a coluna d'água através de processos como dragagens. Desta forma, o presente estudo traz uma série de testes utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* para a sua avaliação e implementação como organismo-teste em ensaios toxicológicos utilizando sedimento. Como análises preliminares, foram realizados testes utilizando sedimento coletado no estuário do rio Maracaípe para confirmar sua condição de controle. O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foi utilizado como substância de referência para determinação da variação de sensibilidade do *T. biminiensis* através da análise da variação da CL_{50} . Testes com diferentes tamanhos de grãos foram realizados com o objetivo de saber se existia alguma preferência desta espécie a alguma faixa de tamanho específico. Posteriormente, ensaios toxicológicos utilizando o sedimento da Baía de Suape em dois períodos (seco e chuvoso) do ano de 2003 foram realizados para avaliar a sua toxicidade. No período de abril de 2005 a janeiro de 2006, a avaliação toxicológica do Porto de Suape foi expandida para o estuário do rio Ipojuca, aumentando também o número de coletas (2 no período chuvoso e 2 no seco). Por último, foram realizadas coletas de sedimento no estuário do rio São Paulo (Bahia, Brasil) um local com histórico de contaminação por hidrocarbonetos. Estas amostras de sedimento foram testadas em bioensaios cujo objetivo foi a comparação da sensibilidade do copépodo *T. biminiensis* e de pós-larvas (PLs) de *Litopenaeus vannamei*. Como resultados, tivemos que o sedimento do estuário do rio Maracaípe não interfere na sobrevivência ou reprodução do *T. biminiensis*. A CL_{50-96h} do $K_2Cr_2O_7$ foi de $9,45 \text{ mg.L}^{-1}$ e para o Cr foi de $3,19 \text{ mg.L}^{-1}$. O *T. biminiensis* não demonstrou preferência quanto ao tamanho do grão. No primeiro ano de coleta no Porto de Suape, observou-se uma mortalidade significativamente superior em relação ao controle no ponto 4 no período seco, porém não foi observado efeito letal ou subletal no período chuvoso. Correlações significativas foram observadas entre a toxicidade letal e os Σn -alcanos e $\Sigma(C_{21}-C_{34})$. No segundo ano de coleta no Porto de Suape e no estuário do rio Ipojuca, não foi observado efeito letal em nenhum ponto de coleta ou período amostrado, porém, efeitos subletais ocorreram em diferentes períodos e pontos de coleta. Maior toxicidade foi observada no mês de julho/agosto (2005), onde ocorreram efeitos subletais em todos os pontos. No estuário do rio São Paulo, não foi observado efeito letal em nenhuma das espécies utilizadas. Porém, efeitos subletais foram observados quando o copépodo foi utilizado, indicando presença de contaminantes no estuário do rio São Paulo em três pontos no mês de março e em apenas um no mês de outubro. Não foi observado qualquer efeito subletal quando utilizamos a PL do camarão em nenhum dos pontos ou meses de coleta. Análises de correlação de Pearson identificaram correlações significativas entre os efeitos subletais observados com o copépodo e os HRP, HTP e MCNR. Ao longo do trabalho as concentrações de metais pesados, HPAs e alifáticos são discutidos. De acordo com este estudo podemos concluir que a área estuarina de Suape, pode ser considerada como uma área com baixo potencial para causar efeitos tóxicos letal. Com relação ao estuário do rio São Paulo, apesar de ser uma área onde observa-se grande quantidade de óleo exudando do solo, é uma área com baixa probabilidade de causar efeito tóxico letal, porém, percebe-se uma variação espacial relevante, pois em um dos pontos, 2 amostras apresentaram mortalidade superior a 80% e a outra, inferior a 10%, daí a importância da realização de réplicas amostrais em campo. Com relação a utilização do copépodo *T. biminiensis*, podemos concluir que é um organismo promissor para ser utilizado em testes de toxicidade com sedimento, pois é uma espécie generalista quanto a granulometria do sedimento, apresenta uma constância na sua sensibilidade quanto a substância de referência e apresentou-se mais sensível do que as PLs do *L. vannamei*.

Palavras-chave: ecotoxicologia, Porto de Suape, Baía de Todos os Santos, sedimento, HPA, metais pesados, *Tisbe biminiensis*, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

Coastal areas suffer with the large amount of pollutants reaching the rivers. These pollutants, in turn, tend to accumulate in the sediment becoming toxic to both organisms which use it as habitat and for those who depend on this environment for their food. Pollutants may become available to the water column by processes such as dredging. Thus, this study offers a series of tests using the benthic copepod *Tisbe biminiensis* for its evaluation and implementation as test organism in sediment toxicity tests. As preliminary analysis, tests were conducted using sediment collected in the estuary of Maracaípe River to confirm its status as a control. Potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) was used as reference substance for determining the sensitivity variation of *T. biminiensis* by analyzing the LC₅₀ variation. Tests with different grain sizes were carried out in order to know whether there was a preference of this species to some specific size range. Subsequently, toxicity tests using sediment from the Suape Bay in two periods (dry and rainy seasons) in 2003 were performed to evaluate its toxicity. From April 2005 to January 2006, toxicological assessment in the Suape Harbour was expanded to the Ipojuca River, also increasing the number of samples (2 in the rainy season and 2 in the dry one). Finally, sediment samples were collected in the estuary of São Paulo River (Bahia, Brazil), site with a history of hydrocarbon contamination. These sediment samples were tested in bioassays whose objective was to compare the sensitivity of the copepod *T. biminiensis* and post-larvae (PLs) of *Litopenaeus vannamei*. As results, the sediment of Maracaípe River showed not interfering on survival or reproduction of *T. biminiensis*. The LC₅₀-96h values were 9.45 mg.L⁻¹ for K₂Cr₂O₇ and 3.19 mg.L⁻¹ for Cr. *T. biminiensis* showed no preference to the grain size. In the first year of sampling in Suape Harbor, there was a significantly higher mortality than in the control point 4, dry season. However, no lethal or sublethal effects were observed in the rainy season. Significant correlation was observed between lethal toxicity and Σn-alkanes, Σ (C₂₁-C₃₄). Concerning the second year of sampling in Suape Harbor and Ipojuca River, no lethal effect was observed at any collection point or sampling period, however, sublethal effects occurred at different times and collection points. Increased toxicity was observed in July/August (2005), where sublethal effects occurred at all points. In the estuary of São Paulo River no lethal effects were observed on any species used. However, sublethal effects were observed when the copepod was used, indicating the presence of contaminants in the estuary of São Paulo river at three points in March and only one in October. There was no sublethal effect when using the shrimp's PL at any point or sampling months. Pearson correlation analysis identified significant correlation between the sublethal effects observed on the copepod and the HRP, HTP and MCNR. Heavy metals concentrations, hydrocarbons and PAHs are also discussed in this work. According to this study, it can be concluded that the estuarine area of Suape may be considered as a site with low potential to cause lethal toxic effects. Concerning São Paulo river, despite being an area where there is much oil exuding from soil, it is a site unlikely to cause lethal toxic effects. However, it is perceived a relevant spatial variation once at one point, 2 samples had mortality values higher than 80% and lower than 10%, respectively; hence the importance of performing field sampling replications. Regarding the use of the copepod *T. biminiensis*, it is concluded that it is a promising organism to be used in toxicity tests with marine and estuarine sediments, since it is a generalist species concerning sediment grain size, has constancy in its sensitivity to the reference substance and was more sensitive than the PLs of *L. vannamei*.

Key-words: ecotoxicology, Suape Harbour, Todos os Santos Bay, sediment, PAH, metals heavy, *Tisbe biminiensis*, *Litopenaeus vannamei*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
PRINCIPAIS SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS NO TEXTO	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE	xiv
1. Introdução Geral	1
2. Hipóteses	7
3. Objetivos	8
4. Capítulo I	10
4.1 Abstract	10
4.2 Resumo	11
4.3 Introduction	12
4.4 Materials and Methods	13
4.4.1 Collection of <i>Tisbe biminiensis</i> for cultivation	13
4.4.2 Copepod cultivation	14
4.4.3 Algal culture	14
4.4.4 Female cultivation for the test	15
4.4.5 Testing the presence of muddy sediment	15
4.4.6 Testing different sediment grain sizes	16
4.4.7 Acute toxicity of potassium dichromate	16
4.4.8 Determination of AVS and metal concentration in the Maracaípe sediment	17
4.5 Results	18
4.5.1 Testing the presence of muddy sediment	18
4.5.2 Testing different sediment grain sizes	18
4.5.3 Acute toxicity of potassium dichromate	20
4.6 Discussion	20
5. Capítulo II	26
5.1 Resumo	27
5.2 Introdução	28
5.3 Material e Métodos	29
5.3.1 Área de estudo.....	29
5.3.2 Bioensaio com <i>T. biminiensis</i>	30
5.3.3 Amostragem e processamento dos sedimentos.....	30
5.3.4 Análises físico-químicas do sedimento do CIPS	33
5.3.4 Análises estatísticas.....	34
5.4 Resultados e Discussão.....	34
5.4.1 Efeito da estocagem do sediment em geladeira.....	34
5.4.2 Bioensaio com sedimentos da Baía de Suape	38
5.4.4 Características geoquímicas do sediment	39
6. Capítulo III	50

6.1	Resumo	51
6.2	Introdução	52
6.3	Material e Métodos	53
6.3.1	Área de estudo	53
6.3.2	Bioensaio com o <i>T. biminiensis</i>	54
6.3.3	Análises físico-químicas do sedimento do CIPS	55
6.3.4	Análises estatísticas	55
6.4	Resultados	57
6.4.1	Parâmetros hidrológicos dos pontos de coleta	57
6.4.2	Bioensaio com o copépodo <i>T. biminiensis</i>	57
6.4.3	Características geoquímicas do sedimento	58
6.4.4	Análises de correlação	59
6.5	Discussão	67
7.	Capítulo IV	73
7.1	Resumo	74
7.2	Introdução	75
7.3	Material e Métodos	76
7.3.1	Área de estudo	76
7.3.2	Coleta das amostras de sedimento	79
7.3.3	Bioensaio com <i>T. biminiensis</i>	79
7.3.4	Bioensaio com o camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	80
7.3.5	Determinação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos	81
7.3.6	Análises estatísticas	82
7.4	Resultados	82
7.4.1	Parâmetros hidrológicos	82
7.4.2	Bioensaio com o copépodo <i>Tisbe biminiensis</i>	82
7.4.3	Bioensaio com o camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	83
7.4.4	Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos	84
7.4.5	Análise de correlação	87
7.5	Discussão	90
8.	Conclusões	93
9.	Referências Bibliográficas	95

1. Introdução Geral

A Sociedade Americana de Química demonstrou que há cerca de 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura científica. Estima-se que cerca de 70 mil são de uso cotidiano, sendo que de mil a 2 mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Tendo em vista as dificuldades de estudos, apenas 2 mil dessas substâncias têm seus efeitos tóxicos conhecidos, o que aumenta a dificuldade de resolução de problemas em casos de acidentes ambientais (Mozeto e Zagato, 2006).

Como o mar cobre cerca de 70% da superfície da Terra e os grandes centros urbanos encontram-se em regiões costeiras, parte significativa das substâncias químicas atinge o ambiente marinho de forma direta ou indireta. Com isso, os ecossistemas costeiros estão sendo afetados, principalmente devido à presença de numerosos compostos químicos sintéticos. Dependendo da origem, das propriedades físico-químicas, quantidades introduzidas e, ainda, das características dos ecossistemas, as substâncias consideradas tóxicas podem ser transportadas e transformadas no ambiente através de diferentes processos (Kenish, 1997).

No processo de transporte, os compostos, orgânicos ou inorgânicos, contaminantes ou não (no caso dos nutrientes), sofrem muitas alterações na sua concentração, a qual pode diminuir (através do processo de diluição) ou aumentar (se ocorrer a reconcentração) ou sofrer transferências de fase. No que se refere a qualidade durante o transporte, os compostos são molecularmente alterados em função de processos como a degradação (bio e fotodegradação) e das múltiplas reações químicas de que os mesmos podem participar, que podem aumentar, diminuir ou mesmo inativar seu poder tóxico (Mozeto & Zagatto, 2006)

As fontes de contaminantes podem ser classificadas em pontuais e não-pontuais. As fontes pontuais são aquelas identificáveis no espaço e no tempo. E as fontes não pontuais ou difusas são aquelas nas quais não é possível identificar o ponto de lançamento dos contaminantes em termos temporais e espaciais no ambiente aquático (Mozeto & Zagatto, 2006). As principais fontes pontuais e não-pontuais de contaminantes consistem em: descargas de esgoto, efluente industrial, material dragado, derrames químicos acidentais, derrames de óleos, escoamentos urbanos e da agricultura e a deposição atmosférica de contaminantes originados de atividades terrestres. E devido à grande variedade de fontes de contaminação, houve um aumento na preocupação com a saúde de ecossistemas costeiros, que conseqüentemente, levou as pesquisas mundiais a focarem sobre efeitos biológicos ocasionados pelos contaminantes (Nipper, 2000).

Os contaminantes podem ser acumulados e biomagnificados e, desta forma, representar riscos para todos os organismos vivos, inclusive o homem. A utilização de testes de toxicidade para avaliação dos efeitos tóxicos potenciais de substâncias no ambiente marinho é importante para tomadas de decisões, possibilitando a minimização e até mitigação de suas conseqüências no ambiente e para o próprio homem. Esses efeitos podem ser letais a curto e/ou longo prazo, e/ou subletais, tais como mudança de comportamento, alterações do crescimento, da reprodução, da tomada de alimento e outros. Sendo assim, a avaliação ecotoxicológica dos efeitos dessas substâncias em organismos marinhos e estuarinos é essencial para a manutenção da biodiversidade e da própria espécie humana (Souza, 2002).

Os organismos apresentam múltiplas respostas ao estresse causado por poluentes. Essas respostas dos organismos aos poluentes dependem da biodisponibilidade, da acumulação e da disposição do contaminante no corpo do organismo e do efeito interativo de múltiplos contaminantes. Efeitos subletais de contaminantes normalmente alteram a disponibilidade de energia para o crescimento e reprodução dos organismos marinhos, que podem ser adversamente afetados podendo reduzir o potencial de desenvolvimento e reprodutivo da população e levar a sérios problemas a longo tempo. Além disto, estas exposições crônicas a contaminantes químicos podem também ocasionar modificações do comportamento adaptativo e alimentar (Kennish, 1997).

Desta forma, os testes ecotoxicológicos são úteis e necessários para a caracterização de amostras ambientais, e muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novos métodos ou o aperfeiçoamento dos já existentes, especialmente no que diz respeito à sensibilidade dos testes e ao tempo de exposição (Aragão e Araújo, 2006).

Contaminação em ecossistemas aquáticos

O crescimento da agricultura e da atividade industrial, aliado ao uso intensivo e derrames acidentais de agrotóxicos e substâncias tóxicas, sejam elas orgânicas (hidrocarbonetos, pesticidas, etc.) ou inorgânicas (metais), próximos de ecossistemas aquáticos, têm causado a contaminação dos mesmos no mundo inteiro. Os rios urbanos oferecem um dos mais explícitos exemplos de como as atividades humanas podem modificar um ecossistema (Rodgher *et al.*, 2005).

Até os anos 90, a avaliação de áreas contaminadas era realizada apenas com auxílio de parâmetros químicos, sem a inserção da avaliação toxicológica. Porém, medições químicas dos níveis de contaminantes ajudam na interpretação de dados biológicos, mas não são suficientes para estabelecer a ocorrência de efeitos tóxicos sobre os organismos.

Desta forma, os ensaios ecotoxicológicos podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas amostras para os organismos vivos; o que apenas a análise química de cada composto, separadamente, não é capaz de avaliar (Nipper, 2000; Sisino *et al.*, 2004).

Ecotoxicologia aquática

O interesse do homem pelas questões ambientais aumentou, principalmente, devido às ocorrências de acidentes com produtos químicos de repercussão mundial, como por exemplo, o uso indiscriminado do DDT nos anos 40 e as contaminações ambientais por mercúrio, cádmio e bifenilas poli-cloradas (PCBs) no Japão. A partir de então vários países (Canadá, Estados Unidos, e outros países da Europa) deram início ao monitoramento ambiental e a pesquisas para avaliação do nível de contaminação de metais e orgânicos em efluentes de vários ramos industriais e em fungicidas utilizados na lavoura (Zagatto, 2006).

Os primeiros relatos de utilização de ensaios de ecotoxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, sendo os peixes os primeiros organismos a serem utilizados. Nas décadas de 1940 e 1950 houve um aumento dos trabalhos nesta área, surgindo diferentes métodos de ensaios e a descoberta de que diferenças nas condições-teste acarretam diferentes resultados, demonstrando a necessidade de padronização dos testes (Aragão e Araújo, 2006).

Nos anos de 50 e 60, foram estabelecidos em vários países, juntamente com a identificação dos agentes tóxicos e suas fontes, critérios e padrões que permitiam a disposição desses agentes em níveis compatíveis à manutenção da qualidade dos recursos hídricos com ênfase na potabilidade (Zagatto, 2006).

Somente na década de 70, com o grande aumento no número de laboratórios dedicados à pesquisa de poluição aquática, ênfase foi dada ao estudo de efeitos subletais, com o uso de uma grande gama de espécies em testes de toxicidade. O número, a variedade e a complexidade dos testes cresceram. Testes de toxicidade foram usados para avaliar efeitos agudos, subletais, mutagenicidade e um número incontável de efeitos da poluição em organismos aquáticos. Havia também uma contínua preocupação na padronização de métodos e na calibração interlaboratorial (Sousa, 2002).

Medidas do controle de poluição foram, na década passada, principalmente, focadas sobre métodos convencionais de detecção da condição ambiental tais como a demanda de oxigênio, material e sólidos em suspensão. Contudo, recente atenção tem sido dada ao controle de substâncias tóxicas. A detecção destes compostos tóxicos em amostras ambientais, e particularmente na água, tem se tornado de grande importância para os órgãos ambientais (Tothill e Turner, 1996).

Embora a ecotoxicologia aquática seja uma ciência jovem, quando comparamos a idade da toxicologia de água doce com a marinha, percebe-se que a primeira possui uma história mais antiga. Segundo Abel e Axiak (1991) esta diferença está principalmente relacionada com o grau de diluição que é muito maior no mar, ou seja, quando um contaminante chega ao ambiente marinho, o poder de diluição desse ecossistema é muito maior do que se a mesma quantidade e tipo de contaminante fosse jogado em um rio. Outra importante consideração a ser feita em relação ao ambiente marinho, é a influência da água salgada sobre as características e comportamento do poluente, que devido aos processos de absorção, adsorção, precipitação e sedimentação rapidamente removem íons dissolvidos na coluna d'água causando sua deposição no sedimento.

Ensaio de ecotoxicidade marinhos estão sendo realizados com diferentes espécies de algas, peixes e invertebrados, utilizando água, sedimento, água intersticial, etc. Os principais organismos utilizados na avaliação da ecotoxicidade de águas marinhas são misidáceos e embriões de ouriços-do-mar. Os misidáceos das espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* tem sido utilizados para avaliação da toxicidade de produtos químicos, efluentes, dispersantes, petróleo e misturas petróleo/dispersante, amostras ambientais e fluidos de perfuração. Os ouriços e as ostras são utilizados em ensaios de ecotoxicidade crônica com base na verificação da fertilização e do desenvolvimento larval (Aragão e Araújo, 2006).

Em termos de organismos marinhos no Brasil apenas os testes com misidáceos, ouriços preferencialmente da espécie *Lytechinus variegatus* e bactérias luminescentes foram padronizados pelas normas da ABNT. Este número é inexpressivo se considerarmos a grande faixa costeira brasileira (mais de 8000 Km), e com variações importantes nos seus ecossistemas (Costa-Lotufo, 2008). Essas poucas espécies marinhas que têm normas padronizadas para ensaios de toxicidade refletem o quanto jovem é a ecotoxicologia marinha no Brasil. No entanto, algumas espécies vêm sendo utilizadas, tais como o mexilhão *Perna perna* (Zaroni, 2002), juvenis da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Nascimento, 1998b) e misidáceo *Mysidium gracile* (Badaró-Pedroso *et al.*, 2002), os copépodos planctônicos *Acartia lilljeborgi* e *Temora stylifera* (Nipper, 2002) e o copépodo bentônico *Nitocra* sp. (Lotufo e Abessa, 2002), o anfípodo *Tiburonella viscana* (Melo e Abessa, 2002), e o tanaidáceo *Kalliapseudes shubartii* (Zamboni e Costa, 2002).

Ensaio ecotoxicológicos usando organismos marinhos e estuarinos como embriões de ouriço-do-mar e bivalves, anfípodos e bactéria *Vibrio fischeri* têm sido bem sucedidos na identificação de sedimentos contaminados com efeitos toxicológicos potenciais (Bejarano *et al.*, 2004; Cesar *et al.*, 2004). Porém, nos últimos anos, *L. variegatus* vem apresentando

uma redução drástica em suas populações ao longo da costa nordeste do Brasil, o que está restringindo bastante a sua utilização em testes ecotoxicológicos (Costa-Lotufo, 2008).

Toxicidade do sedimento

A maior parte dos contaminantes persistentes que chega no mar, proveniente de diversas fontes, acaba depositando-se nos sedimentos. A grande afinidade química por carbono orgânico faz com que contaminantes orgânicos permaneçam associados a partículas de sedimento por longos períodos, mesmo após o término de eventos de lançamento no ambiente. Desta forma, tanto os organismos que utilizam o sedimento como habitat, estando em estreito contato com as partículas e com a água intersticial, como os que vivem ou se alimentam nas proximidades do sedimento podem ser adversamente afetados pela presença dos contaminantes (Abessa *et al.*, 2006; Cesar *et al.*, 2004; Melo e Abessa, 2002; Ingersoll, 1995).

Devido à grande importância dos sedimentos como repositórios de contaminantes e oferecendo substrato para organismos, a resolução no. 344 do CONAMA (2004) prevê a realização de testes ecotoxicológicos para avaliar a qualidade dos sedimentos dragados em complementação à caracterização física e química, com a finalidade de avaliar os impactos potenciais à vida aquática, no local proposto para a disposição do material dragado.

As consequências da exposição direta aos contaminantes presentes no sedimento podem ser variáveis, e vão, desde letalidade aguda até a bioacumulação das substâncias, passando por efeitos crônicos letais e subletais (Abessa *et al.*, 2006). Ensaio ecotoxicológicos estão sendo crescentemente utilizados como parte de estudos de avaliação ambiental integrada a fim de aumentar, junto aos outros parâmetros utilizados como químicos e físicos, o realismo da situação de degradação biológica em que o ambiente se encontra, para que possam ser tomadas decisões apropriadas para cada sistema específico.

Ao contrário dos procedimentos para execução dos ensaios ecotoxicológicos com a fase líquida, os ensaios utilizando organismos bentônicos na avaliação do sedimento ainda não estão bem estabelecidos no Brasil, e quando há a necessidade de avaliação de amostras de sedimento, normalmente são utilizados métodos internacionalmente reconhecidos como os da ISO (International Organization for Standardization), OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) e EPA (Environmental Protection Agency – USA) (Sisinno *et al.*, 2004).

Contudo, a utilização de organismos do plâncton para a avaliação da toxicidade do sedimento, seja através da água intersticial ou elutriado, deve ocorrer com cautela, pois estas espécies podem apresentar uma maior sensibilidade a condições características do

ambiente sedimentar, como por exemplo a amônia, substância que apresenta alta toxicidade aos embriões de ouriço-do-mar. Por isto, é de fundamental importância a ampliação dos estudos nesta área para que possamos ter protocolos padronizados para avaliação ecotoxicológica utilizando sedimento integral.

De acordo com Coull e Chandler (1992), organismos meiobentônicos tem sido um importante grupo na identificação de efeitos de perturbações antropogênicas em ecossistemas aquáticos, isto devido a sua íntima associação e dependência do ambiente sedimentar, alta abundância e curto ciclo de vida. Por isto, organismos da meiofauna, especialmente copépodos, podem ser utilizados com sucesso em testes de toxicidade com sedimento.

Copépodos marinhos harpacticóides bentônicos têm sido utilizados em testes letais e subletais de toxicidade por apresentarem os pré-requisitos necessários para estes testes, como o tamanho reduzido, que facilita a realização dos testes e diminui o custo dos mesmos; e seu hábito epibentônico, que possibilita testar poluentes tanto na fase aquosa quanto aqueles ligados ao sedimento, a exemplo das espécies, *Amphiascus tenuiremis*, *Nitocra spinipes* e *Tigriopus fulvus* (Coull e Chandler, 1992; Bengtsson, 1978; Hutchison *et al.*, 1999; Faraponova, 2005; Bat, 1998).

Em particular, os copépodos marinhos harpacticóides bentônicos do gênero *Tisbe*, representantes de um grupo ecologicamente importante da meiofauna, vem sendo freqüentemente utilizados em testes de toxicidade (ISO 14669, 1999; Miliou *et al.*, 2000; Pounds *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007).

O copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco (1973) teve sua dinâmica em condições de laboratório e aspectos de sua alimentação descritos por Pinto *et al.* (2001) e Araújo-Castro e Souza-Santos (2005).

Este estudo teve como objetivo adaptar uma metodologia de testes de toxicidade da fase sólida de sedimentos lamosos, bem como utilizá-la para avaliar as condições dos sedimentos coletados na Baía de Suape, e nos estuários do Rio Ipojuca (Pernambuco) e Rio São Paulo (Bahia) através de observações de efeitos letais e subletais de *T. biminiensis* expostos a estes sedimentos. Os resultados obtidos com o copépodo quando submetidos ao sedimento de uma área com histórico de contaminação por óleo diesel (estuário do Rio São Paulo) foram comparadas com respostas obtidas pelas pós-larvas (PLs) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, também submetidas ao mesmo tipo de sedimento.

2. Hipóteses

1. O copépodo harpacticóide *T. biminiensis* serve como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos para sedimento, desde que se estabeleça um protocolo experimental para tal espécie e que a mesma seja sensível.
2. Existe toxicidade nos sedimentos coletados na Baía de Suape e nos estuários dos Rios Ipojuca (Pernambuco) e São Paulo (Bahia).
3. Existem diferenças significativas entre a sensibilidade do copépodo *T. biminiensis* e do camarão marinho *L. vannamei* quando expostos ao sedimento do estuário do Rio São Paulo (Bahia), o qual apresenta histórico de contaminação por óleo.
4. Há uma correlação entre os parâmetros geoquímicos e os efeitos tóxicos apresentados pelo copépodo *Tisbe biminiensis*.

3. Objetivos

Capítulo I

Objetivo Geral

Adaptar uma metodologia de avaliação da toxicidade de sedimentos ao copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis*.

Objetivo Específico

- Realizar testes de toxicidade com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para avaliar a sensibilidade de *T. biminiensis* e determinar a concentração letal mediana (CL_{50}) para o cromo e o dicromato de potássio em diferentes períodos de exposição (48, 72 e 96h).
- Testar a influência do tamanho do grão do sedimento na fecundidade e na sobrevivência de *Tisbe biminiensis*.
- Adaptar a metodologia de avaliação da toxicidade do sedimento descrita por Lotufo e Abessa (2002) para ser utilizado com o *Tisbe biminiensis*.

Capítulo II

Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade dos sedimentos coletados na Baía de Suape durante o ano de 2003, utilizando *T. biminiensis*.

Objetivo Específico

- Avaliar a toxicidade letal e subletal dos sedimentos coletados na Baía de Suape durante os períodos seco e chuvoso de 2003 em cinco pontos fixos utilizando o *T. biminiensis*.
- Relacionar a ocorrência de efeitos tóxicos sobre o copépodo *T. biminiensis* e os dados geoquímicos.

Capítulo III

Objetivo Geral

Descrever a toxicidade dos sedimentos coletados na Baía de Suape e no estuário do Rio Ipojuca no período de abril de 2005 à janeiro de 2006 utilizando o copépodo *T. biminiensis*.

Objetivo Específico

- Avaliar a toxicidade letal e subletal dos sedimentos coletados na Baía de Suape durante o período de abril de 2005 a janeiro de 2006 em quatro pontos fixos utilizando o *T. biminiensis*.
- Avaliar a toxicidade letal e subletal dos sedimentos coletados no estuário do Rio Ipojuca durante o período de abril de 2005 a janeiro de 2006 em cinco pontos fixos utilizando o *T. biminiensis*.
- Relacionar a ocorrência de efeitos tóxicos sobre o *T. biminiensis* e o *L. vannamei* com dados geoquímicos obtidos nas mesmas estações e períodos de coleta.

Capítulo IV

Objetivo Geral

Descrever a toxicidade dos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo durante o ano de 2006 utilizando o copépodo *T. biminiensis* e a pós-larva (PL) do camarão *L. vannamei*.

Objetivo Específico

- Avaliar a toxicidade letal e subletal dos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo durante os períodos seco e chuvoso de 2006 em quatro pontos fixos utilizando o *T. biminiensis*.
- Avaliar a toxicidade letal e subletal dos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo durante os períodos seco e chuvoso de 2006 em quatro pontos fixos utilizando o *L. vannamei*.
- Comparar a sensibilidade do copépodo *T. biminiensis* e da PL do camarão *L. vannamei* quando submetidos ao sedimento do estuário do Rio São Paulo, os quais apresentam um histórico de contaminação por óleo.
- Relacionar a ocorrência de efeitos tóxicos sobre o *T. biminiensis* e o *L. vannamei* com dados geoquímicos obtidos nas mesmas estações e períodos de coleta.

4. Capítulo I

Artigo publicado em:

Brazilian Journal of Oceanography, 57(1): 33-41, 2009

SENSITIVITY OF THE MARINE BENTHIC COPEPOD *TISBE BIMINIENSIS* (COPEPODA, HARPACTICOIDA) TO POTASSIUM DICHROMATE AND SEDIMENT PARTICLE SIZE

Cristiane M. V. Araújo-Castro¹, Lília P. Souza-Santos¹, Anny Gabrielle A. G. Torreiro¹ and Karina S. Garcia²

¹Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Oceanografia, CTG
(Arquitetura s/n, Cidade Universitária 50670-901, Recife, PE, Brasil)
crisacastro@yahoo.com.br ou lpss@ufpe.br

²Universidade Federal da Bahia - Instituto de Geociências
Rua Barão de Geremoabo, s/n, sala 305 A1, Federação, 40170-290, Salvador-BA

4.1 ABSTRACT

For the future use of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* in solid-phase sediment toxicological bioassays, the present study investigated the effect of muddy sediment from the Maracaípe estuary (northeastern Brazil), sediment particle size and the reference toxicant potassium dichromate on the species. Muddy sediment from Maracaípe can be used as control sediment, since it does not interfere in the copepod life-cycle and has metal contamination levels that are unlikely to produce any detrimental biological effects on benthic invertebrates. Neither survival nor fecundity was affected by grain size, suggesting that this species can be used with any kind of sediment from muddy to sandy. The sensitivity of *T. biminiensis* to $K_2Cr_2O_7$ in acute tests was similar to that of other organisms. The LC_{50} (lethal concentration to 50% of the test organisms) values for *T. biminiensis* (95% confidence intervals in parentheses) were 7.51 (5.9 – 9.1), 4.68 (2.2 – 7.2) and 3.19 (2.1 – 4.3) $mg L^{-1}$ for Cr in 48, 72 and 96 h, respectively. These results suggest that *T. biminiensis* is a promising organism for use in solid-phase sediment toxicity assessments.

4.2 RESUMO

Para uso futuro do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* em bioensaios toxicológicos utilizando a fase sólida, o presente estudo investigou o efeito do sedimento lamoso do estuário de Maracaípe (Nordeste do Brasil), o tamanho do sedimento e o tóxico de referência dicromato de potássio sobre esta espécie. O sedimento lamoso de Maracaípe pode ser usado como sedimento controle, uma vez que o mesmo não interfere no ciclo de vida do copépodo e possuem níveis de contaminação de metais que não causariam efeitos biológicos em invertebrados bentônicos. Nem a sobrevivência ou fecundidade foi afetada pelo tamanho do grão, sugerindo que esta espécie pode ser usado com qualquer tipo de sedimento de lamoso a areia. A sensibilidade de *T. biminiensis* ao $K_2Cr_2O_7$ em testes agudos foi similar ao de outros organismos. Os valores de CL_{50} (concentração letal a 50% dos organismos) para *T. biminiensis* (95% intervalo de confiança em parênteses) foram 7,51 (5,9 – 9,1), 4,68 (2,2 – 7,2) e 3,19 (2,1 – 4,3) $mg L^{-1}$ para o Cr em 48, 72 e 96h, respectivamente. Estes resultados sugerem que *T. biminiensis* é um organismo promissor para uso em avaliações de toxicidade com a fase sólida do sedimento.

Descriptors: Toxicity, Meiofauna, Toxicity test, Potassium dichromate, Sediment grain size.

Descritores: Toxicidade, Meiofauna, Testes de toxicidade, Dicromato de potássio, Granulometria.

INTRODUCTION

The highest concentrations of contaminants occur in estuarine and shallow coastal marine systems, as these environments are subject to considerable anthropogenic impact from both point and nonpoint sources. This potentially dangerous anthropogenic input is typically associated with accelerated human population growth, the development of coastal areas, agricultural, industrial and municipal discharge as well as commercial and recreational activities, with major impact at the community and ecosystem level (KENNISH, 1997; NIPPER, 2000). Sediments are known to effectively sequester hydrophobic chemical pollutants such as heavy metals and organic pollutants entering bodies of water (McCREADY *et al.*, 2006). Estuaries are the ultimate repository for many pollutants and act as a temporary or long-term storage facility for natural and anthropogenic organic matter from land-based sources. Pollutants may persist in this system and/or become bioavailable to the water column (KENNISH, 1997; McCREADY *et al.*, 2006). Contaminants can lead to the lethality or sub-lethality of organisms in this environment.

In Brazil, a federal law that regulates the release of new formulations of agrochemicals and new legislation for the disposal of dredged material (CONAMA Resolution No. 344, 2004, www.mma.gov.br/conama) require ecotoxicological assays for the management of bodies of water. The new legislation (CONAMA, 2004) establishes sediment quality criteria based on sediment quality guidelines (SQGs) developed in the United States and Canada. Although generic guidelines are frequently considered the best immediately available option, the search for ecologically realistic tests with native species and the field validation of international guidelines is recommended. Thus, academia and environmental agencies have developed adaptations of international toxicity testing methods in recent decades using native species (MELO; NIPPER, 2007).

In Brazil, crustacean species used for marine solid-phase sediment toxicity assessments include the amphipod (*Tiburonella viscana*), the tanaid (*Kalliapseudis schubartii*) and postlarvae of the shrimp (*Litopenaeus* sp., *Penaeus paulensis* and *P. schmitti*). However, methodological tests measuring a variety of endpoints and species are still necessary in order to obtain sufficient data for producing national sediment quality criteria or guidelines (MELO; NIPPER, 2007). LOTUFO; ABESSA (2002) have recommended the use of copepods for sediment toxicity tests.

Meiofauna species, particularly harpacticoid copepods, have been successfully used as indicators of sediment contamination and toxicity in controlled laboratory experiments (COULL; CHANDLER, 1992). The short copepod life cycle facilitates the determination of

life-history-related endpoints, so several copepod species have been used successfully in toxicity tests.

Harpacticoid copepods of the genus *Tisbe* are particularly useful as bioassay organisms due to their high abundance in sediments, wide geographic distribution, short life cycles and amenability to laboratory cultures and handling (POUNDS *et al.*, 2002). *Tisbe battagliai* is an internationally recognized test species for assessing water and sediment quality and, more importantly, is suitable for toxicity identification evaluation (TIE) (THOMAS *et al.*, 2003). The ISO 14669 (1999) has standardized a protocol to evaluate water quality through the acute lethal toxicity in three copepod species (including *Tisbe battagliai*) in the copepodit stage.

Tisbe biminiensis VOLKMANN-ROCCO 1973 possesses one of the highest exponential rates of population increase (r) obtained for a meiobenthic copepod. It has a short generation time and high reproductive potential (PINTO *et al.*, 2001; SOUZA-SANTOS *et al.*, 2006). It is easily cultured under laboratory conditions; requires low sample volumes; does not need a large amount of space for cultivation; and has an easily observable lethal endpoint. Moreover, due to its epibenthic habits, it may be exposed to both sediment and water samples. This makes *T. biminiensis* a promising test organism for sediment toxicological assessments.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the acute tolerance of the copepod *Tisbe biminiensis* to potassium dichromate as a reference toxicant and the influence of sediment particle size on lethal and sub-lethal endpoints during sediment bioassays, which are pre-requisites for the future use of this species in solid-phase sediment toxicity tests.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Collection of *Tisbe biminiensis* for Cultivation

Tisbe biminiensis is an epibenthic harpacticoid copepod. The species was collected from the intertidal area of the sandy beach known as Farol Beach in Olinda, Pernambuco (NE Brazil). This beach is located in an urban area and is subject to high amounts of organic input from urban sewage. A sample of sand containing stranded seaweed was collected and taken to the laboratory. The seaweed was washed with filtered seawater and this seawater was placed with the sand in an aquarium for one week. Oviparous female copepods were then taken from the aquarium, observed under the stereomicroscope and isolated to be

reared. *Tisbe biminiensis* is very large and conspicuous in comparison with the others present on this beach. The females were individually placed in glass vessels containing filtered seawater and microalgae (diatoms) until new adults emerged. Some adults were then removed from each group for identification under the microscope. All groups identified as *Tisbe biminiensis* were joined together to assure genetic variability.

4.4.2 Copepod Cultivation

Tisbe biminiensis was cultivated in a substrate-free medium represented by 500 mL vessels with seawater filtering (25 and 3 μ m CUNO[®] in sequential filtration) and salinity of 35 \pm 2. Cultures were maintained in a climate-controlled room with the temperature maintained at between 25 and 27°C and a 12-h dark/light photoperiod. Basic commercial fish food (All Plus[®]) and diatoms (*Thalassiosira fluviatilis* or *Phaeodactylum tricornutum*) were offered to the copepods once a week. The water was completely changed once a week, passing the entire content of the plastic vessels through a 64- μ m sieve. The organisms retained in the sieve were transferred to clean vessels with 500 mL of filtered seawater, 20 mL of algal suspension and 100 mg of fish food (SOUZA-SANTOS *et al.*, 2006). Before every toxicity test, whenever a large number of ovigerous females were required, the volume of the cultures was increased to 5 L, starting from 500 mL cultivation.

4.4.3 Algal Culture

Tisbe biminiensis developed better when fed with diatoms than with flagellates (PINTO *et al.*, 2001). Thus, two diatom species (*Thalassiosira fluviatilis* and *Phaeodactylum tricornutum*) were used in the present study. Microalgae were cultivated in f/2 medium (GUILLARD, 1975). For the preparation of the medium, tris-HCl buffer (pH 7.7) and f/2 nutrient stock were added to natural filtered seawater (35 \pm 1‰) before sterilization in an autoclave. The f/2 vitamin solution (biotin, B12 and thiamine) was sterilized through filtration (0.2 μ m) and added to the medium just prior to algal inoculation. The algal cultures were incubated at room temperature (26 \pm 1 °C) with a 12-h light/dark photoperiod. The concentration of microalgae was expressed as units of chlorophyll-a (μ g Chl-a mL⁻¹).

4.4.4 Female Cultivation for the Test

The age of the first brood of *T. biminiensis* ranged from 7.6 to 10.8 days and total lifespan of *T. biminiensis* females ranged from 29 to 32.9 days (PINTO *et al.*, 2001). To minimize natural mortality, 12 day-old ovigerous females were used in the tests. To obtain fixed-age females, main stock copepods were poured through 250- μm sieves and organisms retained on the sieve were transferred to 20 L vessels containing 5 L of filtered seawater and food 13 days prior to the start of a test. After 24 h, the copepod group was poured through the same sieve and adults were transferred to another vessel. Water renewal and feeding were performed twice a week. After 12 days, ovigerous females were collected for use in the test. When ovigerous females were very abundant in the culture before 12 days, younger females could also be used.

4.4.5 Testing the Presence of Muddy Sediment

The *Tisbe biminiensis* used in the present study was collected on a sandy beach, but in the laboratory, they grow as well in substrate-free media as in a sandy substrate (SOUZA-SANTOS *et al.*, 2006). Thus, testing was performed to evaluate the behaviour of this copepod in muddy sediment. Groups of 10 ovigerous copepod females were submitted to two treatments: one with muddy sediment and 20 mL of the diatom suspension (0.2 μg Chl-a mL^{-1}) and the other only with the diatom suspension. The experiments with the sediment followed the procedures recommended by LOTUFO; ABESSA (2002), who indicate the use of sieving to remove sand, vegetable debris, other fragments and possible predators from the sediment.

The muddy sediment was collected at low tide from the top 2 cm of the Maracaípe Estuary (S 08°32'21.8" W 35°00'14.5"), a well-preserved mangrove area far from urban centers and with a very small drainage basin. In the laboratory, the wet sediment (200 to 300 g) was poured through a 63 μm sieve with a small volume of filtered seawater and left to settle overnight at 4 °C in glass containers. The next day, the supernatant was removed through aspiration and 2 g of the sediment, which was the minimum amount necessary to form a 0.5-cm layer on the bottom, was placed in each test container. The container used in the bioassays was a 40-mL glass vessel with a plastic stopper (4.5 cm \varnothing and 5 cm height). Twenty milliliters of the diatom suspension (0.2 μg Chl-a mL^{-1}) was then added to each test container and the entire test system was incubated at 25°C, with a 12:12h light/dark photoperiod. There were 5 replicates for each treatment. After 24 h, ten ovigerous females were placed into each test container. The experiment lasted seven days, which was a

sufficient period to observe both mortality (lethal effect) and fecundity (sub-lethal effect). Every other day, 1 mL of concentrated diatom suspension was added. At the start and end of the experiments, pH, oxygen concentration and salinity were determined. After 7 days, females and offspring were collected by gently pouring the control sediment through a 63- μm sieve. After checking for live females, samples were stained with Rose-Bengal and fixed with formaldehyde (4%). Stained individuals were counted using a stereomicroscope.

Mean mortality and fecundity were compared using ANOVA after testing for the normality of the data (Kolmogorov-Smirnov test) and variance homogeneity (Bartlett test). The Kruskal-Wallis non-parametric test was used when the data were not normal or variances were not homogeneous. The Tukey test was used to identify significant differences between means (pairwise comparisons). The significance level was set at 0.05. An overview of the experiments is given in Table 1.

4.4.6 Testing Different Sediment Grain Sizes

To study the effect of sediment grain size on the survival, fecundity and development of *T. biminiensis*, an experiment was performed with four grain size fractions (Table 1) and a control (without sediment). These fractions were obtained by sieving sediment from the Maracaípe Estuary through different mesh sizes (250, 125 and 63 μm).

In these experiments, 10 ovigerous females were placed in each test container 24 h after the introduction of sediment and diatom suspension. The experiments were performed in the same manner as in the previous test (Table 1).

4.4.7 Acute Toxicity of Potassium Dichromate

Bioassays with reference substances are necessary for the evaluation of the sensitivity of the animal group used in toxicological tests. A minimum of five tests are necessary to establish the repeatability of results (ISO 14669, 1999; U.S. EPA, 1988). In order to evaluate the sensitivity of ovigerous *T. biminiensis* females to potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), twelve experiments were performed to determine the 48, 72 and 96-h LC 50 (Table 1).

Each container received 10 ovigerous females and 20 mL of the diatom suspension with five different concentrations of potassium dichromate (5, 10, 15, 20 and 25 mg L^{-1} ; established in a preliminary test) and a control (without potassium dichromate). There were 5 replicates for each concentration. After the introduction of the females, all replicates were incubated at 25°C and a 12:12 h light/dark photoperiod. At the start and end of the experiments, pH, salinity and the oxygen concentration were determined.

Table 1. Experimental conditions of the tests undertaken using the *Tisbe biminiensis*.

Experiments			
	Testing the presence of muddy sediment	Testing different sediment grain size	Acute toxicity of potassium dichromate
Treatments	With and without sediment	GR0 = only water GR1 = sediment < 63µm GR2 = sediment > 63µm and < 125µm GR3 = sediment > 125µm and < 250µm GR4 = sediment > 250 µm and < 2 mm	0 (control), 5, 10, 15, 20 and 25 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ L ⁻¹
Replicates	5	5	5
Food	Diatom suspension	Diatom suspension	Diatom suspension
Number of organisms per chamber	10 ovigerous females	10 ovigerous females	10 ovigerous females
Temperature	25° C	25° C	25° C
Light regime	12/12 light/dark	12/12 light/dark	12/12 light/dark
salinity	34 ± 1	34 ± 1	34 ± 1
Addition of food	Every other day	Every other day	Without addition of food
Duration of experiment	10 and 7 days	7 days	96h

Observations were made every 24 h and dead females were removed. The lethal concentration killing 50% (LC₅₀) of organisms in 48, 72 and 96 h was estimated using the Trimmed Spearman-Kärber method with Abbot's correction (HAMILTON *et al.*, 1977).

4.4.8 Determination of AVS and Metal Concentration in the Maracaípe Sediment

The determination of metal concentrations (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) in sediment samples followed the methodology of ALLEN (1993), as described by SILVERIO (1999). In this method, 3 g of wet sediment was reacted with 20 ml of HCl 6 mol.L⁻¹ in a cold, N₂ atmosphere. The final HCl concentration in the balloon was 2 mol. L⁻¹. The metals were determined through Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) after being filtered in quantitative paper and calibrated with 50ml de-ionized water.

4.5 RESULTS

4.5.1 Testing the Presence of Muddy Sediment

During the test, *T. biminiensis* adults and offspring were not observed swimming in containers with sediment, indicating that this species has a strong relationship with the sediment.

The adult mortality (Student's $t = -0.2769$, $p = 0.7941$) and female fecundity (Student's $t = -1.8332$, $p = 0.1164$) were not statistically different as between containers with and without muddy sediment (Fig. 1). The mortality was below 10% in both treatments. At the end of one week, ten *T. biminiensis* females produced a mean (\pm SD) of 236 (\pm 145) and 206 (\pm 74) offspring in the treatments with and without muddy sediment, respectively.

The metal concentrations in the muddy sediment from the Maracaípe Estuary are presented in Table 2. For most metals, the concentrations were very low and undetectable.

4.5.2 Testing Different Sediment Grain Sizes

In relation to grain size, neither survival (ANOVA, $F = 2.159$, $p = 0.1204$), number of nauplii (ANOVA, $F = 2.630$, $p = 0.0733$), number of copepodites (ANOVA, $F = 2.634$, $p = 0.0730$) nor fecundity (ANOVA, $F = 2.707$, $p = 0.0677$) were significantly different between treatments (Fig. 2). Survival was higher than 90% and fecundity was above 150 individuals in all treatments.

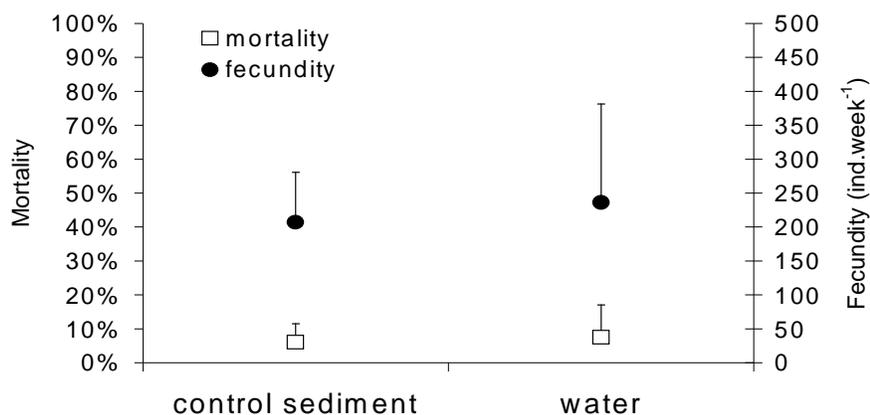


Fig. 1. Mortality and fecundity (means \pm 1 SD) of *Tisbe biminiensis* females exposed to the control sediment and in seawater for 7 days. n=5.

Table 2. Metal concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) estimated in the sediment samples of Maracaípe estuary collected on March 2007 compared to effects-range sediment guidelines by NOAA and Long *et al.* (1995).

Metals	Control sediment Mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{g}$)	NOAA ($\mu\text{g}/\text{g}$)			Long <i>et al.</i> (1995) ($\mu\text{g}/\text{g}$)	
		TEL	PEL	Bgd	ERL	ERM
Cd	n.d.	0.676	4.21		1.2	9.6
Cr	3.76 \pm 1.05	52.3	160	37	81	370
Cu	1.10 \pm 1.77	18.7	108.2	17	34	270
Ni	1.84 \pm 0.27	15.9	42.8	13	20.9	51.6
Pb	1.84 \pm 3.07	30.2	112.2	16	46.7	218
Zn	13.21 \pm 2.95	124	271	48	150	410

n.d. – not detectable; TEL – Threshold Effect Level; PEL – Probable Effects Level; Bgd – Background; ERL – Effects Range-Low; ERM – Effects Range Median.

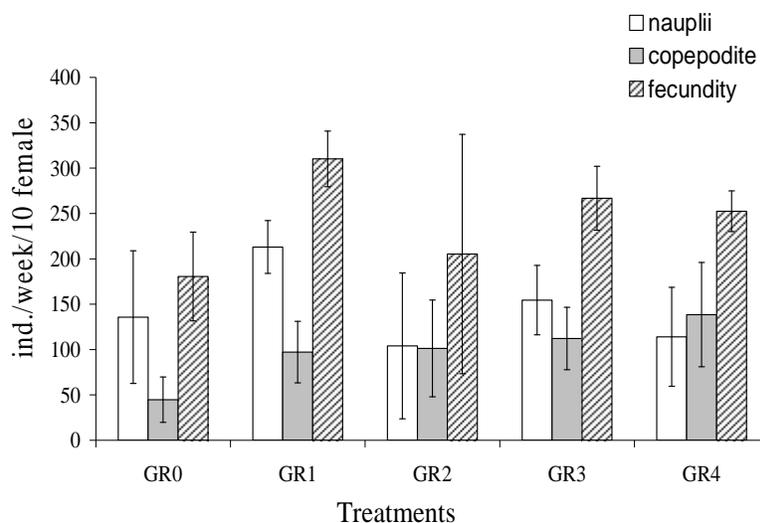


Fig. 2. Mean nauplii number, copepodite number and fecundity of *Tisbe biminiensis* obtained with different grain sizes (GR0 = only seawater; GR1 = less than 63 μm ; GR2 = greater than 63 μm and less than 125 μm ; GR3 = greater than 125 μm and less than 250 μm ; and GR4 = greater than 250 μm and less than 2 mm).

4.5.3 Acute Toxicity of Potassium Dichromate

T. biminiensis was sensitive to the reference substance. Table 3 displays the means \pm standard deviation of acute toxicity observed at different time periods at 25°C after 12 tests. Little variability was observed between the replicates of the bioassay with potassium dichromate, resulting in low coefficient variation.

DISCUSSION

The results of these experiments suggest that *Tisbe biminiensis* is a promising organism for use in solid-phase sediment toxicity tests. This species is as sensitive as other test organisms used for the assessment of sediment toxicity (Table 4) and was highly independent in relation to sediment particle grain size. This study is the first step in an attempt to develop a simple standardized laboratory toxicity test with a tropical benthic copepod to evaluate estuarine and marine sediments.

In developing a marine-estuarine sediment bioassay protocol, a number of properties are desirable, such as a high survival rate under control conditions; occupation of microhabitat, preferably below the sediment-water interface to ensure maximum and consistent exposure to sediment contaminants; a broad geographic range to enhance the breadth of its application as a test species; ease of collection, handling and maintenance in

the laboratory; ecological importance in estuarine ecosystems; the ability to be cultured or year-round availability from the field; and low sensitivity to natural sediment variables, such as particle size and organic content, to allow a wide variety of sediment types to be tested (INGERSOLL, 1995).

In the present study, *T. biminiensis* demonstrated low sensitivity to different particle sizes, as no significant differences were found in its life cycle in relation to grain size. The muddy sediment did not interfere in the life cycle of the copepod, demonstrating that *T. biminiensis* collected from a sandy beach may be used as test organism in bioassays with this type of sediment. While some species of amphipods are tolerant to different grain sizes, e.g., *Leptocheirus plumulosus* (DeWITT *et al.*, 1992), others may exhibit survival or growth reduction as a result of unsuitable sediment particle size distribution, e.g., *Rhepoxynius abronius*, *Grandidiella japonica* and *Tiburonella viscana* (MELO; NIPPER, 2007).

In relation to sensitivity to reference toxicants, the coefficient of variation for the LC₅₀ recommended by Environment Canada (1992) is 30%, and the coefficients observed in the present study were 10.8, 26.8 and 17.9% (at 48, 72 and 96 h, respectively) for K₂Cr₂O₇ and Cr, demonstrating that *T. biminiensis* sensitivity did not vary substantially between tests and remained below the recommended level.

Table 3. Mean LC50 (\pm standard deviation) and coefficient of variation (CV) in different period (48, 72 and 96h) of K₂Cr₂O₇ and Cr for *Tisbe biminiensis*. n = 12.

	CL50 mg L ⁻¹ (\pm SD)		
	48h	72h	96h
K ₂ Cr ₂ O ₇	22.22 (\pm 2.30)	13.84 (\pm 3.72)	9.45 (\pm 1.68)
Cr	7.51 (\pm 0.81)	4.68 (\pm 1.26)	3.19 (\pm 0.57)

Table 4 displays the LC₅₀ of *T. biminiensis* and other organisms. *T. biminiensis* seems to be more resistant to K₂Cr₂O₇ than *Tiburonella viscana* and *Tisbe longicornis*. However, it is more sensitive than *T. Holothuriae* and *Palaemon elegans* and is as sensitive as *Tiburonella viscana*. Thus, different organisms can respond differently to the same substance and *T. biminiensis* demonstrated both sensitivity and consistency in its response to this toxicant.

Bioassays with benthic copepods have been developed in several places in the world. The genus *Tisbe* has wide geographic distribution (VOLKMANN, 1979) and it has frequently been used in lethal and sub-lethal toxicity tests due to its easy maintenance in the laboratory, high sensitivity to toxins and ecological importance (SILVA *et al.*, 2000).

Table 4. Median lethal concentrations (LC50) of K₂Cr₂O₇ and Cr obtained with *Tisbe biminiensis* and others organisms.

Species	Duration	Conditions	LC50 (mg L ⁻¹)		Reference
			K ₂ Cr ₂ O ₇	Cr	
<i>Amphipod</i>					
<i>Tiburonella viscana</i>	48h	25 ± 2 °C	11.217	3.79	Abessa; Sousa (2003)
<i>Tiburonella viscana</i>	48h	25 °C		5.85	Melo; Nipper (2007)
<i>Shrimp</i>					
<i>Palaemon elegans</i>	96h	16 °C	43.96	14.86	Lorenzon <i>et al.</i> (2001)
<i>Copepod</i>					
<i>Tisbe longicornis</i>	48h	20 °C	10	3.38	Larrain <i>et al.</i> (1998)
<i>Tisbe holoturiae</i>	48h	24 °C		16.12	Coull; Chandler (1992)
<i>Tisbe biminiensis</i>	48 h	25 °C	21.61	7.51	This study
	96h	25 °C	10.77	3.19	

T. biminiensis has a short life cycle, fast development, high reproductive potential and one of the highest rates of increase among harpacticoids in cultures (ARAÚJO-CASTRO; SOUZA-SANTOS, 2005; PINTO *et al.*, 2001; SOUZA-SANTOS *et al.*, 2006). This species has been cultured under laboratory conditions since 1998 and has demonstrated its ability to reach high densities, thereby facilitating its use in toxicity tests. A single female *T. biminiensis* may produce up to nine broods during its life-time, with a mean 66.8 nauplii per brood. Females lay a new egg-sac 2 days after nauplii are born (PINTO *et al.*, 2001). Therefore, the high reproductive potential of *T. biminiensis* can facilitate the observation of sub-lethal effects.

Advanced age and inadequate food quality and quantity may cause high mortality and low fecundity in *T. biminiensis* (PINTO *et al.*, 2001). Thus, bioassays require the use of *T. biminiensis* females with the same age (12 ± 1 day) and the addition of food every other day in order to minimize the effects of these factors on mortality and fecundity. The duration of a bioassay must not be more than 7 days; otherwise the counting of stained females to estimate survival will be hampered due to offspring development.

The sediment from the Maracaípe Estuary used in the present study had low concentrations of heavy metals. According to Carreira (personal communication), this sediment has low HPA and aliphatic concentrations, 44.9 ng g⁻¹ and 0.262 µg g⁻¹, respectively.

This low contaminant concentration and high survival and fecundity rates make the Maracaípe sediment a good control.

In conclusion, *T. biminiensis* demonstrated high tolerance to a wide range of sediment grain sizes. The species has moderate and relatively constant sensitivity to the reference substance sodium dichromate. It may therefore be suggested that this species has high potential for use in routine solid-phase sediment toxicity tests using the procedures described here, although additional tests are required, such as the investigation of its tolerance to ammonia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by RELINE (Resíduos Líquidos do Nordeste). The first and third authors received financial support from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico* (CNPq). The authors wish to thank S.O. Lourenço and Alfredo Galvez for the microalgal strains, and P.J.P. Santos, S. Neumann-Leitão, P.S.M. Carvalho, C. Medeiros-Limongi and the anonymous referees for their suggestions.

REFERENCES

- ABESSA, D.M.S.; SOUZA, E.C.P.M. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* (Platyschnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, p. 53-55, 2003.
- ALLEN, H.E.; EU, G.; DENG, B. Analysis Acid-volatile Sulfid (AVS) and Simultaneously Extracted Metals (SEM) for the estimation of Potential Toxicity in Aquatic Sediments. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 1441 – 1453, 1993.
- ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P. Are the diatoms *Navícula* sp. and *Thalassiosita fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 327, p. 58-69, 2005.
- COULL, B.C.; CHANDLER, G.T. Pollution and meiofauna: Field, laboratory, and mesocosm studies. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, v. 30, p. 191-271, 1992.
- DeWITT, T.H.; REDMOND, M.S.; SEWALL, J.E.; SWARTZ, R.C. Development of a chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods. **Contribution No. N-240, USEPA/ERL—Narragansett**, 1992.

- ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. **Report EPS 1/RM/26**. Environment Canada, Ottawa, 1992.
- INGERSOLL, C.G. Sediment tests. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, ed. G.M. Rand, Taylor and Francis, Academic Press, New York, pp. 231-255, 1995.
- ISO 14669. **Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)**. Geneva, Switzerland. First edition. 1999-04-01, 1999.
- KENNISH, M.J. **Pollution impacts on marine biotic communities**. Marine Science Series. CRC Press., 1997, 308p.
- LARRAIN, A.; SOTO, E.; SILVA, J.; BAY-SCHMITH, E. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to $K_2Cr_2O_7$ under varying temperature regimes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, p. 391-396, 1998.
- LOTUFO, G.R.; ABESSA, D.M.S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações para o Brasil**. São Paulo, 2002. p. 151-162.
- LORENZON, S.; FRANCESE, M.; SMITH, V.J.; FERRERO, E.A. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 459-472, 2001.
- McCREADY, S.; BIRCH, G.F.; LONG, E.R. Metallic and organic contaminants in sediments of Sydney Harbour, Australia and vicinity – A chemical dataset for evaluating sediment quality guidelines. **Environ. Internat.**, v. 32, p. 455-465, 2006.
- MELO, S.L.R.; NIPPER, M. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyischnopidae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 66, p. 412-420, 2007.
- NIPPER, M. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective. **Aquat. Ecosys. Health Manage.**, v. 3, p. 433-447, 2000.
- PINTO, C.S.C.; SOUZA-SANTOS, L.P.; SANTOS, P.J.P. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. **Aquaculture**, v. 198, p. 253-267, 2001.
- POUNDS, N. A.; HUTCHINSON, T. H.; WILLIAMS, T. D.; WHITING, P.; DINAN, L. Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. **Mar. Environ. Res.** V. 54, p. 709-713, 2002.

- SILVA, E.M.; CHASTINET, C.B.A.; NAVARRO, M.F.T.; BARROS, A.F.; CAVALCANTE, P.; MOTA, M.F.V. Utilização de ensaios de ecotoxicidade com *Tisbe holothuriae* (Copepoda: Harpacticoida) em programas de avaliação da toxicidade de efluentes complexos. In: Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira Neto, A.L. **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, 2000. p. 451-460.
- SILVÉRIO, P.F. Partição, biodisponibilidade e Toxicidade de metais Pesados a Organismos Bentônicos em Sedimentos. São Carlos,. 78f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, 1999.
- SOUZA-SANTOS, L.P.; PASTOR, J.M.O.; FERREIRA, N.G.; COSTA, W.M.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SANTOS, P.J.P. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. **Aquac. Res.**, v. 37, p. 1516-1523, 2006.
- THOMAS, K.V.; BARNARD, N.; COLLINS, K.; EGGLETON, J. Toxicity characterization of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. **Chemosphere**, v. 53, p. 1105-1111, 2003.
- US EPA. Short term methods for estimating the chronic toxicity and effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA/600/4-87/028, 1988.
- VOLKMANN, B. *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida) species from Bermuda and zoogeographical considerations. **Arch. Oceanogr. Limnol.**, v. 19, p. 1-76, 1979.

(Manuscript received 24 January 2008; revised

03 June 2008; accepted 15 August 2008)

5. Capítulo II

**O uso do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* para
avaliação da toxicidade da fase sólida de sedimento lamoso
da Baía de Suape (Brasil) no ano de 2003**

5.1 RESUMO

Este capítulo teve como objetivo avaliar o efeito letal (mortalidade) e subletal (fecundidade) ocorrido com o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* quando submetido ao sedimento superficial da Baía de Suape. O Complexo Industrial Portuário de Suape, que é uma fonte de contaminação em potencial, está localizado ao sul do Estado de Pernambuco, distando 40 km da cidade do Recife. Para a realização deste estudo, amostras de sedimento foram coletadas em dois períodos (seco e chuvoso) de 2003 em cinco estações na Baía de Suape. O sedimento controle foi coletado no estuário de Maracáipe-PE, uma área distante de grandes centros urbanos e indústrias. Com o sedimento coletado foram feitas análises de: metais (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V, e Zn), hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) e bioensaios utilizando *T. biminiensis*. Os resultados do bioensaio mostraram um efeito letal significativo na estação 4, na desembocadura do rio Massangana, durante o período seco. Porém, nenhum efeito letal ou subletal foi observado nas coletas realizadas durante o período chuvoso. Correlações positivas significativas foram observadas entre efeito letal e Σn -alcanos e $\Sigma(C_{21}-C_{34})$. As concentrações de metais e HPA nos sedimentos coletados foram baixas quando comparadas com outras áreas consideradas poluídas. Este estudo mostrou que o *T. biminiensis* pode ser um importante organismo-teste para ensaios de toxicidade utilizando sedimento marinho e/ou estuarino.

5.2 INTRODUÇÃO

Ambientes marinhos costeiros, especialmente sistemas parcialmente fechados como as baías, estão sob forte estresse proveniente do desenvolvimento urbano e industrial. No Brasil, mais de 50% da população humana vive ao longo da zona costeira, onde as indústrias estão também predominantemente localizadas, impondo uma elevada pressão ecológica neste ecossistema (Martins *et al.*, 2005). No litoral pernambucano, um complexo industrial portuário foi construído na área estuarina de Suape em 1979/1980 e causou grandes modificações na geomorfologia, na sedimentologia e na hidrodinâmica desta região (Koenig *et al.*, 2003; Neumann-Leitão e Matsumura-Tundisi, 1998).

As ações resultantes da construção e da operacionalização de um complexo industrial portuário, como o de Suape, são geradoras de diversas fontes de poluição tais como: dragagens, navegação, estradas, efluentes de empresas, esgotos domésticos e águas de lavagem. Todas essas atividades podem ser responsáveis pela contaminação de estuários e de zonas costeiras (Fernandes, 1999).

O ambiente portuário e, mais especificamente, os sedimentos portuários contêm usualmente uma complexa mistura de componentes provenientes das operações de navios e indústrias próximas. Com o incremento da economia e incorporação de atividades industriais às portuárias, essa mistura tem sofrido alterações, resultando em um aporte com composição física e de níveis de diferentes contaminantes (Chagas, 2003). Na sua maioria estes são conservativos, ou seja, não são sujeitos ao ataque bacteriano e mesmo quando o são, são numa longa escala de tempo, sendo acrescidos praticamente de modo permanente ao ambiente marinho (Pellegrini *et al.*, 1999; Wang e Slack, 2000).

Em portos industriais, os metais pesados são uns dos principais contaminantes, como resultado de suas atividades de navegação, de transferências e transporte de cargas e de descarga industrial (Chiu-Wen Chen *et al.*, 2007). Além dessas atividades já citadas, as estradas (devido ao escoamento pluvial) e os esgotos domésticos são importantes fontes de poluição aquática. Essas atividades apresentam grandes riscos para o ambiente costeiro e o seu entorno. O uso de metais pesados como indicativo de poluição ambiental está relacionado com o seu efeito tóxico e com a sua capacidade de permanecerem nos diferentes compartimentos tanto bióticos quanto abióticos, por esse motivo vem-se intensificando estudos sobre poluição ambiental por metais pesados nas últimas décadas (Silva Junior, 2008).

Os despejos provenientes do terminal de álcool e derivados de petróleo têm grande impacto potencial para a vida aquática, decorrente da introdução de hidrocarbonetos no ambiente aquático. Pequenas quantidades de petróleo, quando somadas às de outras fontes,

como no caso do Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), podem vir a ser carga tóxica anual bastante representativa (Fernandes, 1999).

Os hidrocarbonetos compreendem um grupo de compostos orgânicos xenobióticos que são transferidos para o ambiente pela queima de combustíveis fósseis ou mesmo por vazamentos durante o transporte e armazenamento dos óleos minerais. Por outro lado, os hidrocarbonetos poliaromáticos são formados através da repolimerização de fragmentos de hidrocarbonetos durante a queima. Eles podem ser bastante tóxicos para organismos aquáticos devido a sua característica de se bioacumular nos tecidos gordurosos (Mozeto e Zagatto, 2006).

O presente estudo teve como objetivo, avaliar a toxicidade letal e subletal causada pela exposição do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* ao sedimento estuarino da Baía de Suape (Pernambuco, Brasil), onde um complexo portuário industrial está operando desde 1980. Os resultados dos testes de toxicidade serão correlacionados com os dados geoquímicos dos sedimentos coletados simultaneamente.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Área de estudo

A Baía de Suape é parcialmente isolada do Atlântico Sul por uma extensa linha de recife de arenito e está localizada a 40 km sul do Recife ($8^{\circ}15'-8^{\circ}30'S$ e $34^{\circ}55'-35^{\circ}05'W$) (Fig. 5.1). Em 1980, o Complexo Industrial Portuário de Suape foi implantado nesta área. Antes de sua implantação, quatro rios (Massangana, Tatuoca, Ipojuca e Merepe) convergiam para a Baía de Suape, e hoje, apenas os dois primeiros rios mantiveram seus cursos (Koenig *et al.*, 2003; Neumann-Leitão e Matsumura-Tundisi, 1998).

A faixa de salinidade na Baía de Suape durante as amostragens esteve entre 32 e 36‰ no período seco, e entre 16 e 35 no período chuvoso.

Este sistema recebe uma elevada carga de esgoto doméstico e resíduos de 71 indústrias, principalmente de usinas de cana de açúcar e destilarias de álcool (Koenig *et al.*, 2003). As fontes de contaminação na região podem ser agrupadas como internas, formadas pelas indústrias localizadas dentro do complexo industrial portuário e material dragado; e externas que incluem indústrias localizadas na bacia de drenagem, o escoamento de produtos vindo da agricultura e águas pluviais (Fernandes, 1999).

Toxicidade letal associada ao sedimento foi observada na Baía de Suape e na desembocadura do rio Massangana, sugerindo que este sedimento pode estar transportando os contaminantes do estuário para a área costeira (FADE, 2006). A qualidade da água no rio Massangana foi considerada poluída, provavelmente devido a resíduos de indústrias localizadas próximas a esta área (CPRH, 2006).

5.3.2 Bioensaio com *T. biminiensis*

Para a realização do bioensaio utilizando o copépodo foram utilizadas fêmeas ovadas com idade conhecida (10 ± 2 dias de idade), este procedimento foi realizado para reduzir o efeito do envelhecimento nos resultados. O método para obtenção de fêmeas com a mesma idade está descrito no Capítulo I desta tese. Durante o bioensaio, 1 mL de suspensão de diatomácea foi adicionado a cada 2 dias, para que a falta de alimento não interferisse no resultado do experimento. Os parâmetros utilizados neste experimento foram mortalidade (efeito letal) e fecundidade (efeito subletal).

Paralelamente a cada experimento utilizando sedimento, foi realizado teste com substância de referência ($K_2Cr_2O_7$) para testar a suscetibilidade do grupo de fêmeas utilizadas no bioensaio. O teste de referência teve duração de 96 horas, o efeito observado foi mortalidade, e a cada 24 horas foram realizadas observações e as fêmeas mortas foram registradas e retiradas do recipiente-teste. Ao final de 96 hora foi calculada a CL_{50-96h} pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

5.3.3 Amostragem e processamento dos sedimentos

O sedimento controle foi coletado no estuário do rio Maracaípe durante a baixa mar, tendo o cuidado de coletar apenas os 5 primeiros centímetros. O rio Maracaípe está localizado a 75 km ao sul da cidade do Recife e distante de grandes centros urbanos e indústrias. O sedimento controle era coletado sempre uma semana antes da coleta do sedimento teste, chegando ao laboratório o sedimento foi peneirado e mantido em geladeira a 4°C em recipientes de vidro até sua utilização nos bioensaios.

O sedimento teste foi coletado em cinco pontos da Baía de Suape nos meses de fevereiro (períodos seco) e junho (período chuvoso) durante o ano de 2003. As estações 1, 2 e 3 apresentam maior influência das atividades portuárias, a 4 com influência de indústrias localizadas ao longo do rio Massangana e do riacho Algoduais, e a estação 5 sob influência dos barcos de pesca (Fig. 5.1).

Em cada estação, o sedimento superficial (até 5 cm) foi coletado com uma draga do tipo van Veen de 1 kg ou manualmente com auxílio de espátula, no caso de pontos localizados no médio litoral (estação 4), ou em sacos plásticos em locais onde o mergulho se fazia necessário (estações 2 e 5). Em cada estação, quatro amostras foram coletadas, para avaliação da variabilidade espacial.

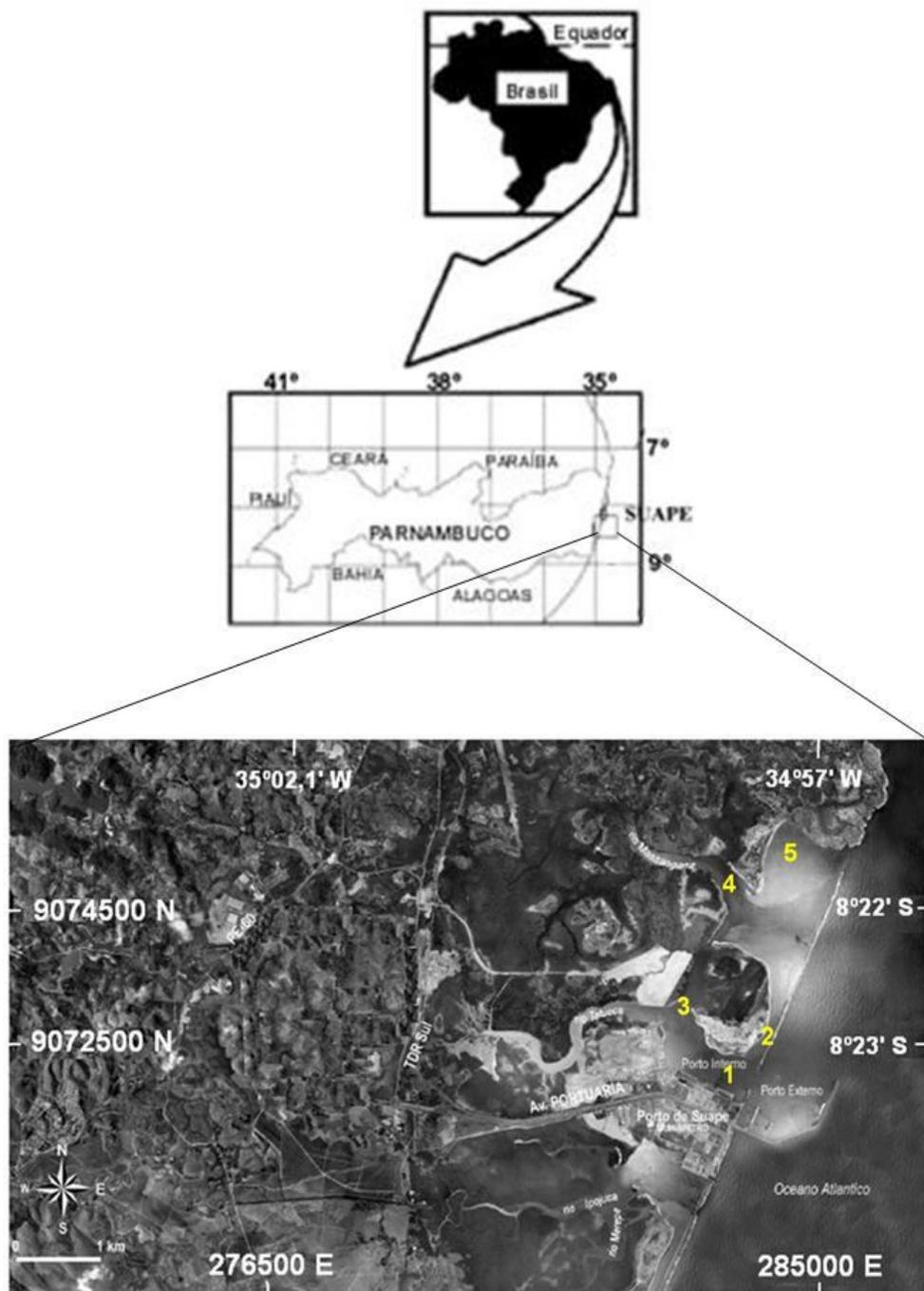


Fig. 5.1 – Mapa adaptado de FADE (2006) com a localização do Porto de Suape, que se encontra na região nordeste do Brasil no estado de Pernambuco, onde foram determinados os cinco pontos de coleta (1 – $8^{\circ}21'22.2''S$ e $34^{\circ}57'17.6''W$; 2 – $8^{\circ}23'04.9''S$ e $34^{\circ}57'24.6''W$; 3 – $8^{\circ}23'22.2''S$ e $34^{\circ}57'52.1''W$; 4 – $8^{\circ}22'54.1''S$ e $34^{\circ}58'06.2''W$; e 5 – $8^{\circ}21'42.7''S$ e $34^{\circ}57'56.4''W$).

No laboratório, os sedimentos coletados (controle e teste) e submetidos ao peneiramento úmido por compressão para a remoção de possíveis predadores e para facilitar a observação da sobrevivência no final do experimento. As amostras coletadas durante o período seco foram peneiradas utilizando-se uma malha de 125 μm de abertura, e quando necessário, foi utilizado um pouco de água coletada em cada estação, e no caso do controle a água utilizada foi água de diluição do laboratório, onde são cultivados os copépodos. A coleta seguinte, durante o período chuvoso, os sedimentos foram peneirados com malha de 100 μm de abertura. A diminuição do tamanho da malha utilizada entre os bioensaios ocorreu devido a perda de náuplios recém eclodidos pela malha de 125 μm . Depois do peneiramento, o sedimento fino (< 125 e $100 \mu\text{m}$) foi mantido em geladeira a 4°C em recipientes de vidro por um período de 24 horas até a distribuição do sedimento nos recipientes-testes para o início dos bioensaios.

Das quatro amostras coletadas em cada estação, duas foram utilizadas nos testes imediatamente (48 horas) após a coleta, e as outras duas foram guardadas em recipientes de vidro em geladeira a 4°C por um período de 60 dias, no caso das amostras coletadas no período seco, e 11 dias, naquelas coletadas durante o período chuvoso. O sedimento era guardado devido a falta de estrutura para realizar todas as amostras de uma só vez. O período em que o sedimento ficou guardado foi diminuído para evitar possíveis modificações químicas no sedimento. Cada bateria de teste era composta por uma amostra de cada estação e sedimento controle sendo realizadas duas de cada vez, cada tratamento e controle apresentaram cinco réplicas.

Todos os recipientes-testes receberam sedimento peneirado (2 g) e 20 mL de suspensão de diatomáceas ($0,2 \mu\text{g Chl-a mL}^{-1}$), e foram levados para estufa incubadora com temperatura de $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12 h de claro/escuro por um período de 24 horas. Posteriormente, 10 fêmeas ovígeras com idade controlada foram adicionadas em cada recipiente-teste. O bioensaio teve duração de 7 dias, e a cada 2 dias foi adicionado alimento em cada recipiente. No final do experimento, todo o conteúdo de cada réplica foi cuidadosamente passado por peneira com o mesmo tamanho de abertura de malha utilizado para peneirar o sedimento, e após a retirada do sedimento era checada a sobrevivência das fêmeas adultas. Após a checagem da sobrevivência, todo o conteúdo era fixado com formol a 4% e corado com Rosa de Bengala para posterior contagem em estereomicroscópio dos descendentes produzidos ao longo do experimento.

5.3.4 Análises físico-químicas do sedimento do CIPS

Todas as análises físico-químicas foram realizadas na amostra de sedimento total. A composição do sedimento foi determinada usando métodos padrões. Análises granulométricas foram feitas segundo Suguio (1973). A matéria orgânica e o carbonato foram determinados pela diferença do peso do sedimento após queima a 450 °C durante 6 horas e após tratamento com HCl, respectivamente, como descrito em Loring e Rantala (1992).

A concentração total de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V, e Zn, foi determinada através da digestão total nos sedimentos, realizada em triplicatas a partir 0,3 g de amostra seca correspondente a cada ponto coletado. As amostras após a pesagem foram acondicionadas em bombas de teflon em mistura de ácidos concentrados nas seguintes proporções: 7 mL de HNO₃, 6 mL de HF e 3 mL de HCl. Após esta etapa as bombas foram levadas ao bloco digestor a 130 °C por 12 horas. Em seguida foi adicionado 7 mL de água régia (HCl:HNO₃, 3:1) e as bombas foram fechadas novamente e mantidas no bloco digestor por mais 12 horas a 130 °C. As amostras foram levadas a estado de secura e retomadas com 10 mL de HNO₃ 0,5N (Pozebon *et al.*, 2004). A determinação dos metais foi realizada no ICP – AES (Varian Liberty Series II).

O protocolo de extração de hidrocarbonetos foi baseado no método do EPA 3540. Amostras de sedimento (~10 g, peso seco) foram extraídas com solvente (diclorometano:acetona, 1:1, v/v) em um Soxhlet. Após a adição de deuterado n-C₁₆ e n-C₃₀ (alifáticos) e p-terphenil-d₁₄ (aromáticos) como substituto padrão. O volume do extrato foi reduzido por evaporação rotatória e uma ligeira corrente de N₂ purificado, antes da troca do solvente por n-hexano. A separação das classes de hidrocarbonetos foi realizada em coluna de vidro (com 1,3 cm de diâmetro interno) contendo 11 g de sílica-gel e 1 g de alumina (5% H₂O desativado). Cobre ativado foi adicionado no topo da coluna para remoção de enxofre. As frações alifáticas e aromáticas extraídas com hexano e hexano:diclorometano 1:1 v/v, respectivamente. A fração alifática foi determinada pelo GC/FID usando um Agilent 6890 munido com uma coluna HP5 (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de película) e as seguintes condições: 60 °C por 0,5 min, 60-300 °C em 6 °C.min⁻¹ e segura em 300 °C por 10 min; injetor de temperatura: 290 °C; detector de temperatura: 300 °C. A identificação dos alifáticos foi baseado no tempo de retenção obtido pela injeção de uma solução padrão contendo todos os compostos em foco na faixa de n-C₁₄ a n-C₃₄. a quantificação foi baseada na curva de calibração preparada com a mesma mistura padrão na faixa de 250 ng.mL⁻¹ a 10.000 ng.mL⁻¹ e o deuterado n-C₂₄ como padrão interno. O limite de quantificação de alcanos individuais foi 10 ng.g⁻¹.

A fração aromática de hidrocarbonetos foi determinado seguindo uma versão modificada do método do EPA 8270D. A determinação foi realizada por cromatografia em

fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa (Finnigan modelo TraceGC / Polaris Q), operando no modo EI (70 eV) e em *full scan* (50-550 um), mantendo-se a mesma programação de temperatura da análise no cromatógrafo com detector de ionização por chama. A mistura de naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} , em uma concentração de 100 ng.mL^{-1} no extrato final foi usado como padrão interno. O instrumento foi calibrado usando 8 soluções (na faixa de 5 a 1.000 ng.mL^{-1}) preparado com a mistura contendo os 16 HPA prioritários USEPA considerado pelo método mais 2-etilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, dibenzotifeno, 2,3dimetilnaftaleno, peryleno e o padrão interno deuterado (fixado em 100 ng.mL^{-1} em todas as soluções). Em adição aos 16 HPA (naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno and benzo(ghi)pireno), os seguintes compostos foram quantificados: dibenzotiofeno e seus alquilados (C_1 a C_3), 1- e 2- metilnaftalenos, C_2 a C_4 naftalenos, C_1 a C_3 fluorenos, C_1 a C_4 fenantrenos, C_1 a C_2 pirenos e C_1 a C_2 crisenos. A soma das concentrações de todos os compostos é denominada aqui como “HPA total”. O limite de quantificação de compostos individuais foi $0,1 \text{ ng.g}^{-1}$.

5.3.5 Análises estatísticas

Para comparação de médias de mortalidade e fecundidade entre as estações de coleta e também entre os sedimentos estocados e os não-estocados utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores. Antes da execução da ANOVA foram testadas normalidade dos dados, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, e homocedacidade das variâncias, como o teste de Bartlett. O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas dois a dois. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para identificar correlações entre os dados biológicos, através dos bioensaios com *T. biminiensis*, e as análises físico-químicas do sedimento.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Efeito da estocagem do sedimento em geladeira

Nas coletas realizadas durante o período seco, a sobrevivência foi significativamente diferente (ANOVA dois-fatores, $F = 12.327$, $p = 0.0007$) entre os sedimentos estocados (baterias 3 e 4) e não-estocados (baterias 1 e 2) em geladeira, e também em relação as estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 92.518$, $p < 0.0001$). A sobrevivência foi significativamente reduzida em todas as estações em que o sedimento foi estocado, exceto na estação 4, onde observou-se uma mortalidade de 100% das fêmeas submetidas ao

sedimento não-estocado, enquanto que com os sedimentos estocados a sobrevivência foi superior a 67%. A fecundidade foi significativamente diferente entre os grupos onde o sedimento foi estocado em comparação com os que não foram estocados (ANOVA two-way, $F = 38.192$, $p = 0.0004$), e também com relação às estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 44.861$, $p < 0.0001$). Interações significativas foram observadas (ANOVA two-way, $F = 3.227$, $p = 0.0003$) entre as estações de coleta e entre os grupos nos quais os sedimentos foram estocados (Fig. 5.2).

Nas coletas realizadas no período chuvoso, o período em que os sedimentos foram estocados em geladeira foi diminuído para 11 dias, porém, diferenças significativas ainda foram observadas na sobrevivência considerando a estocagem do sedimento (ANOVA two-way, $F = 4.980$, $p = 0.0287$). Com relação às estações de coleta, não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência entre as estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 1.791$, $p = 0.1253$). A fecundidade foi afetada pelo armazenamento do sedimento (ANOVA two-way: $F = 6.140$, $p = 0.0155$) e também pelas estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 3.495$, $p = 0.0069$). As interações entre armazenamento do sedimento e estações de coleta não foram significativas com relação a sobrevivência (ANOVA two-way, $F = 0.875$, $p = 0.5024$) ou fecundidade (ANOVA two-way, $F = 0.622$, $p = 0.6837$) (Fig. 5.3).

Os resultados do presente estudo sugerem que as diferenças significativas, tanto com o efeito letal quanto com o subletal, tenham ocorridas por conta do armazenamento do sedimento. ASTM (2008) traz como tempo de armazenamento para sedimento que será utilizado em testes de toxicidade um período de 2 semanas em refrigerador a 4°C, e recomenda nunca congelar sedimento para este tipo de análise. Este procedimento ocorre em alguns trabalhos como os de Wernersson *et al.* (2000), que armazenaram o sedimento por um período de 5 semanas a 4°C, e Cesar *et al.* (2004), Geffard *et al.* (2003) e Lau & Chu (1999), que armazenaram por um período máximo de 7 dias, nas mesmas condições descritas anteriormente, e em nenhum destes estudos, os autores levantam a hipótese de uma possível modificação geoquímica nestes sedimentos quando guardados.

Ainda segundo ASTM (2008) o tempo de armazenamento do sedimento para testes de toxicidade pode ser estendido por um prazo maior do que 2 semanas, e isto vai depender do tipo e da magnitude do contaminante presente, por exemplo, se o contaminante for o mercúrio o sedimento pode ser armazenado por até 6 semanas, porém, se o contaminante for um pesticida, PCB, HPA, esse período pode cair para 7 dias. Então, considerando as recomendações da ASTM e os resultados do presente estudo, o armazenamento das amostras de sedimento em 4°C deve ser minimizado ao máximo, principalmente quando não se conhece o tipo de contaminante presente na amostra de sedimento.

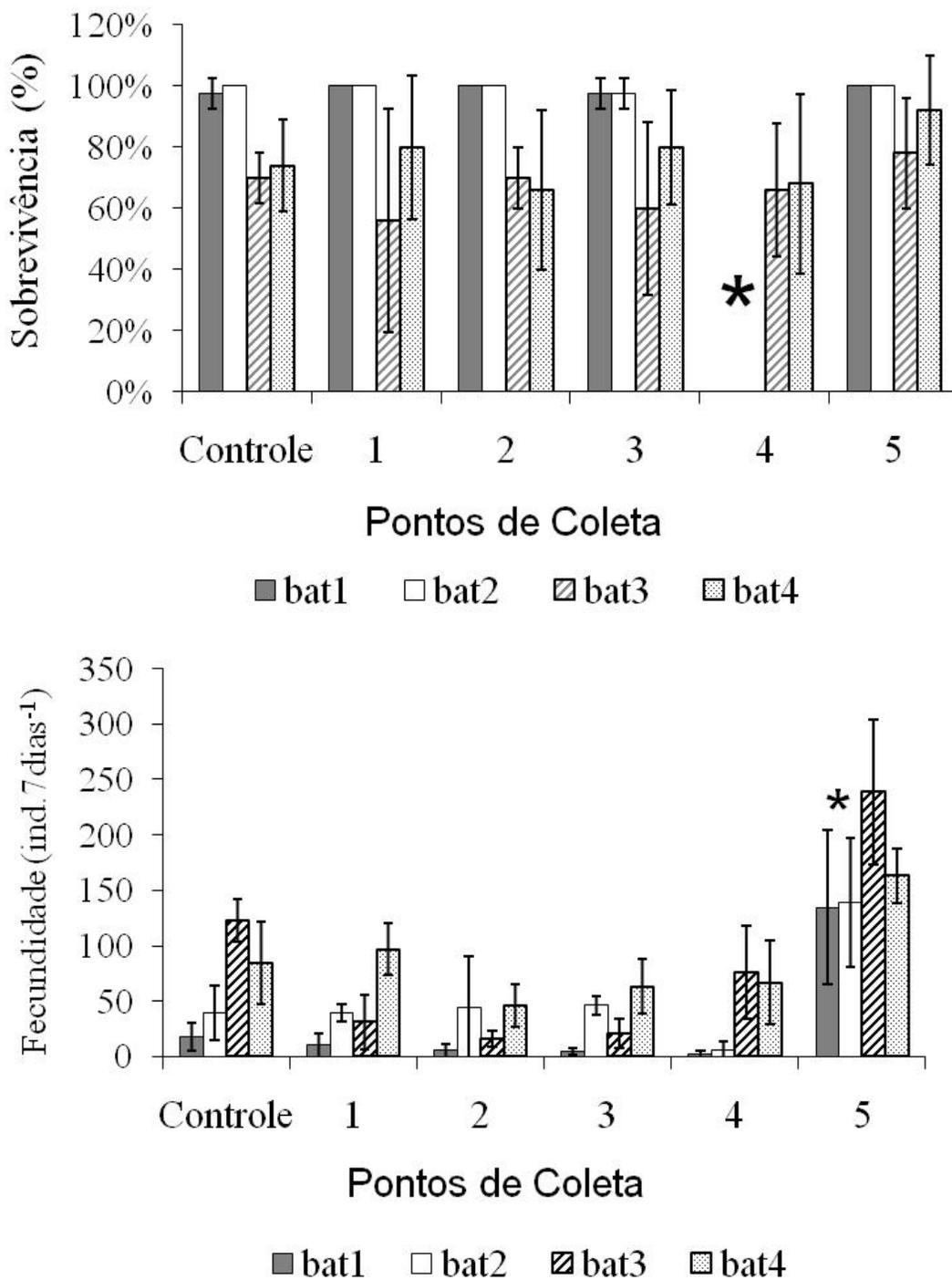


Fig. 5.2 – Sobrevivência (a) e fecundidade (b) de fêmeas de *Tisbe biminiensis* expostas aos sedimentos da Baía de Suape amostrados durante o período seco (Fevereiro de 2003) e chuvoso (junho de 2003) e de sedimento controle (Maracáipe/PE). ind.7 dias⁻¹: número médio de descendentes produzidos durante 7 dias; valores expressos em média \pm 1 desvio padrão.

* significa diferenças em relação ao controle pelo teste de Tukey.

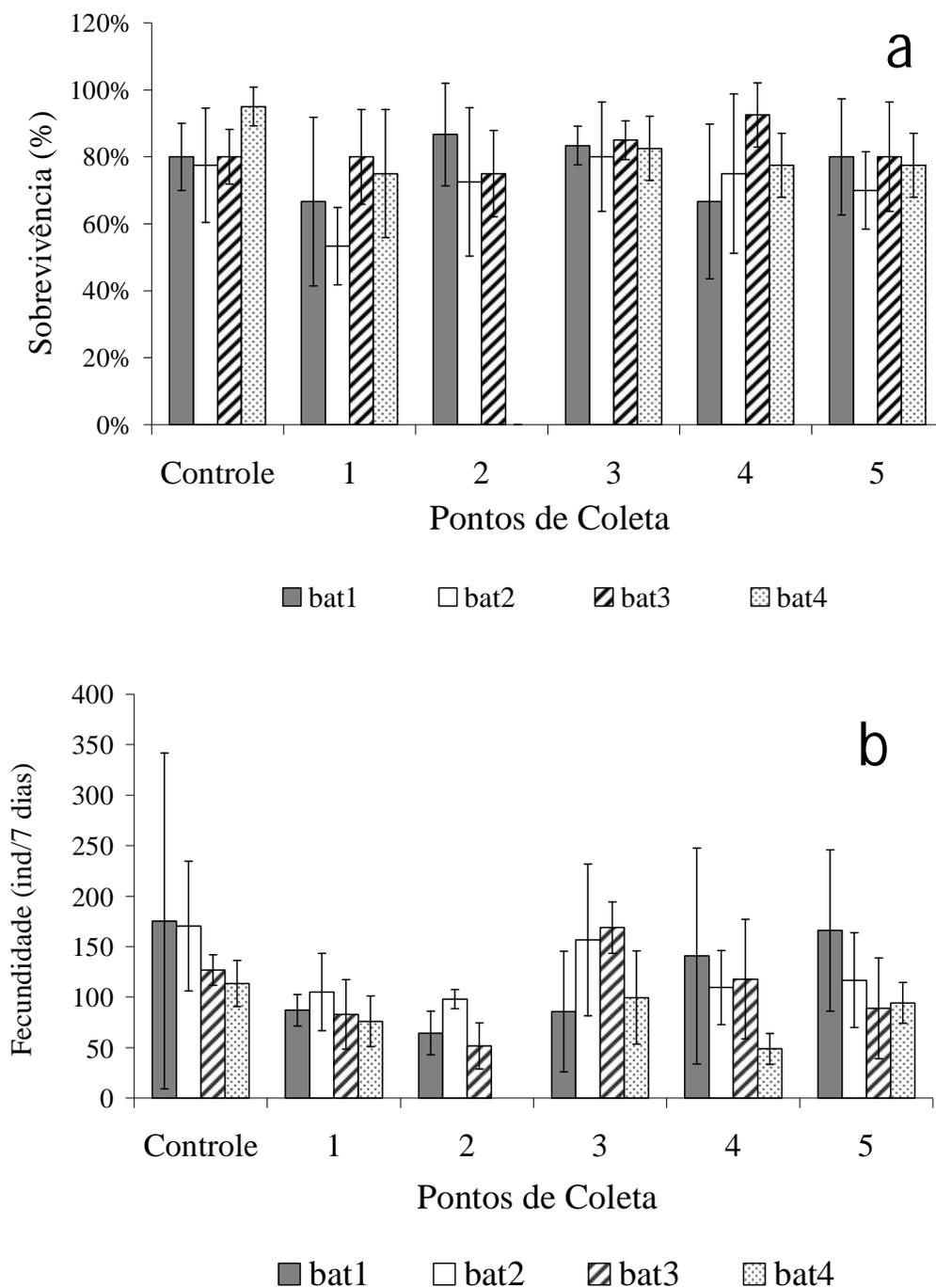


Fig. 5.3 – Sobrevivência (a) e fecundidade (b) de fêmeas de *Tisbe biminiensis* expostas aos sedimentos da Baía de Suape amostrados durante o período chuvoso (Junho de 2003) e sedimento controle (Maracaípe/PE). ind.7 dias⁻¹: número médio de descendentes produzidos durante 7 dias; valores expressos em média \pm 1 desvio padrão. * significa diferenças em relação ao controle pelo teste de Tukey.

5.4.2 Bioensaio com sedimentos da Baía de Suape

Para comparação entre as estações de coleta foram utilizados apenas os resultados obtidos com as amostras que não foram armazenadas (baterias 1 e 2). A sobrevivência foi significativamente diferente entre as estações durante o período seco (ANOVA two-way, $F = 312.3$, $p < 0.0001$), mas não entre as baterias 1 e 2 (ANOVA two-way, $F = 0.053$, $p = 0.8223$). As interações entre estações de coleta e baterias não foram significativas (ANOVA two-way, $F = 0.305$, $p = 0.9065$). O teste de Tukey indicou que na estação 4 houve um decréscimo significativo na sobrevivência das fêmeas (Fig. 5.2a).

Durante o período chuvoso, não houve diferença significativa na sobrevivência entre as estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 1.613$, $p = 0.1880$) ou entre as baterias 1 e 2 (ANOVA two-way, $F = 0.407$, $p = 0.5354$). As interações entre estações de coleta e baterias não foram significativas (ANOVA two-way, $F = 0.305$, $p = 0.9060$) (Fig. 5.3a).

Contextualizando os resultados obtidos, podemos inferir que, o efeito letal observado na estação 4 durante o período seco pode estar sendo minimizado em condições de campo, uma vez que a fração testada no bioensaio (silte e argila) representou apenas 12% do sedimento do local (a granulometria é mostrada na Tab. 5.1), levando a um fator de diluição da toxicidade *in situ* do sedimento total. O bioensaio com sedimento da estação 4 durante o período chuvoso não mostrou efeito letal, evidenciando diferenças na biodisponibilidade de contaminantes entre os períodos de coleta.

Em relação a fecundidade, diferenças significativas foram observadas entre estações de coleta durante o período seco (ANOVA two-way, $F = 18.407$, $p < 0.0001$) mas não entre as baterias 1 e 2 (ANOVA two-way, $F = 1.374$, $p = 0.0537$). A interação entre as estações e as baterias não foram significativas (ANOVA two-way, $F = 0.506$, $p = 0.7700$). O teste de Tukey indicou um aumento significativo da fecundidade na estação 5 em relação a todas as outras estações e controle (Fig. 5.2b).

O sucesso reprodutivo pode ser reduzido pela concentração do alimento, tanto em casos onde a concentração é muito baixa quanto em casos onde é muito elevada (Araújo-Castro e Souza-Santos, 2005). Além da concentração do alimento, a qualidade do mesmo também interfere no sucesso reprodutivo (Pinto *et al.*, 2001; Souza-Santos *et al.*, 1999; Williams e Jones, 1999). As maiores fecundidades na estação 5 no presente estudo pode estar correlacionada a presença de prados de fanerógamas. As comunidades de fanerógamas são conhecidas por seu papel ecológico e grande contribuição para a produtividade de muitos ambientes costeiros no mundo (Larkum *et al.*, 2006), elas também servem como substrato para micro e macroalgas epífitas e, o mais importante, as epífitas são altamente produtivas (Dawes, 1997). Desta forma, as fanerógamas podem estar oferecendo

uma melhor condição, principalmente de fonte alimentar para o *T. biminiensis*, usado nos bioensaio, e promovendo maior fecundidade.

Durante o período chuvoso, a fecundidade não foi significativamente diferente entre as estações de coleta (ANOVA two-way, $F = 1.546$, $p = 0.2066$) e entre baterias (ANOVA two-way, $F = 0.184$, $p = 0.2066$). A interação entre estações de coleta e baterias não foi significativamente (ANOVA two-way, $F = 0.566$, $p = 0.7254$). Nas estações 1 e 2 contudo, foi observado uma diminuição de 50% na fecundidade em relação ao controle. Devido a grande variabilidade no controle não foi possível detectar diferenças significativas com relação a fecundidade nas diferentes estações de coleta.

Bejarano e Chandler (2003) observaram que uma redução maior que 25% na sobrevivência de adultos ou em algum parâmetro reprodutivo poderia influenciar potencialmente o crescimento populacional a longo tempo, resultando em um rápido declínio populacional. Ainda neste estudo, os autores observaram que os parâmetros reprodutivos foram mais sensíveis aos efeitos de sedimentos contaminados do que a sobrevivência de adultos de *Amphiascus tenuiremis*, e 6 das 18 estações de coleta apresentaram uma redução no parâmetro reprodutivo superior a 25% em relação ao controle, sugerindo um alto risco a longo prazo.

Foi observado no presente estudo que, em geral, os valores de fecundidade aumentaram quando comparamos o primeiro experimento realizado com sedimento coletado no período seco com o segundo utilizando sedimento coletado no período chuvoso. Este fato pode estar relacionado com a disponibilidade de alimento natural, e/ou pelo fato da malha utilizada para retirada do sedimento no final do experimento ter sido trocada por uma de abertura inferior (de 120 μm no período seco por 100 μm no período chuvoso). Com base nesses resultados, sugerimos que em experimentos futuros a malha a ser utilizada no peneiramento do sedimento para o início do bioensaio seja de 63 μm de abertura, e que no final do experimento não ocorra o peneiramento, e todo o conteúdo seja fixado, deixando o peneiramento para ser realizado antes da contagem. Este procedimento pode evitar a perda dos náuplios recém eclodidos. Com relação à observação do efeito letal, o mesmo pode ser determinado pela coloração das fêmeas, ou seja, aquelas que estiverem coradas de vermelho intenso estavam vivas, enquanto que aquelas que não foram coradas estavam mortas no final do experimento. Também se faz necessária atenção na introdução de alimento durante o experimento, para assegurar os valores de fecundidade normais.

5.4.3 Características geoquímicas do sedimento

A fração fina do sedimento (fração < 63 μm composto por silte e argila) variou de 12 a 65% no período seco, e de 12 a 66% no período chuvoso. Houve uma alta percentagem de

sedimento fino nas estações 1 e 2 em ambos os períodos e também na estação 5 durante o período seco. A concentração de matéria orgânica (M.O.) variou de 2,6 a 12,9% no período seco e de 3,2 a 11,8% no período chuvoso (Tab. 5.1).

Tab. 5.1

Concentração de matéria orgânica (M.O. em %) e análise de granulometria dos sedimentos amostrados na Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco) e junho (período chuvoso) do ano de 2003.

Local	M.O.		Tamnho do grão (phi)		cascalho (%)		areia (%)		silte (%)		argila (%)	
	dp	rp	dp	rp	dp	rp	dp	rp	dp	rp	dp	rp
1	12,9	11,8	3,673	4,057	5,440	0,02	41,8	33,28	47,5	62,8	5,2	3,9
2	5,8	5,3	3,493	4,087	0,07	0,08	66,31	35,08	31,2	64,1	2,4	0,7
3	8,4	4,4	2,012	1,491	5,18	1,75	77,98	89,74	14,5	6,8	2,3	1,7
4	8,0	6,7	1,629	2,428	13,54	0,7	74,22	86,76	8,6	10,4	3,7	2,1
5	2,6	3,2	3,974	3,014	0,17	0,27	50,4	83,75	41,2	15,7	8,3	0,3

Os resultados das concentrações de metais na fração total do sedimento (<2000 µm) são mostrados na Tab. 5.2. As maiores concentrações dos metais Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, V e Zn foram observados nas estações 1 e 2.

Quando comparamos a Baía de Suape com outras áreas é possível observar que as concentrações de metais nesta área são menores do que em outras áreas consideradas como poluídas, como é o caso da Baía de Guanabara – Brasil (Vilela *et al.*, 2004), o porto de Vitória – Brasil (Jesus *et al.*, 2004), o estuário do Rio Hugli – Índia (Sarkar *et al.*, 2004), o Porto de Sydney – Austrália (McCready *et al.*, 2006) e o Noroeste do Mar Egeu – Grécia (Zabetoglou *et al.*, 2002) (Tab. 5.3).

Tab. 5.2

Concentração dos metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) encontrados nas amostras de sedimento da Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por ps) e junho (período chuvoso representado por pc) do ano de 2003 e os limites para metais em sedimentos descritos por Long *et al.* (1995).

Metais	Baía de Suape										Media	Long <i>et al.</i> (1995)	
	1		2		3		4		5			ERL	ERM
	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc			
Al	23.8	34.2	21.4	31.5	23.6	13.3	15.7	23.5	17.8	17.6	22.2		
Ba	110	222	231	204	219	221	83.9	156.3	271	208	192.6		
Cd	1.4	1.6	1	1	0.8	0.4	0.6	0.49	0.2	0.3	0.78	1.2	9.6
Cr	28.3	32.4	21.3	22.8	17.8	8.4	13.3	10.92	5.3	6.4	16.7	81	370
Cu	11	12.9	4.6	5.5	3.4	2.5	3.5	4.29	3.8	4.4	5.6	34	270
Fe	14	14.8	8.7	8.3	7.9	4.6	6.1	7.67	3.4	4.1	8		
Mn	22.4	49.6	39	32.2	19.4	26.1	43.1	36.5	53	49.3	37.1		
Ni	9.4	8.2	8	4.4	5.4	7.6	1.9	3.18	3	0.9	5.2	20.9	51.6
Pb	9.4	12.5	12.9	16.8	11.6	13.9	7.6	4.86	9.6	11.6	11.1	46.7	218
V	35.8	42.2	26.1	34.3	25.4	8.9	13.4	18.6	7.4	8.6	22.1		
Zn	19.6	23.1	14.9	18	12	7	9.5	10.5	8.7	10.6	13.4	150	410

Al e Fe em mg.g^{-1} . ERL – effect range low. ERM – effect range median.

Tab. 5.3

Concentrações mínimas e máximas de metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) encontradas nos sedimentos da Baía de Suape e em outros locais.

Place	Metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ exceto para Al e Fe (mg.g^{-1}))											Autor
	Al	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	V	Zn	
Baía de Suape – Nordeste do Brasil	13-34	84-231	0.2-1.6	5-32	3.4-13	3.4-15	22-50	0.9-9	5-17	7-42	7-23	Presente estudo
Baía de Guanabara – RJ-Brasil				75-230	35-1450			30-110	45-135		115-850	Vilela <i>et al.</i> (2004)
Porto de Vitória – ES-Brasil	52-94			62-103	11-119	36-52	147-477	31-53	10-74		48-355	Jesus <i>et al.</i> (2004)
Rio Hugli – Nordeste da Índia	19-31	59-76	nd-0.2	29-49	21-64	25-40	459-862	26-44	14-25	29-47	26-162	Sarkar <i>et al.</i> (2004)
Mar Egeu – Greece			0.2-6.3	18-148	0,5-76	9-19	104-239		3.1-86		35-1014	Zabetoglou <i>et al.</i> (2002)
Porto de Sydney – Australia			0.2-10	6-298	3-1060			2-75	5-1420		17-11300	McCready <i>et al.</i> (2006)
Porto de Ceuta – Norte da África				13-381	5-865	3.1-41.1	61-332	8-671	10-516		29-695	Guerra-García and García-Gómez (2005)

Concentrações em $\mu\text{g.g}^{-1}$ exceto para Al e Fe (mg.g^{-1})

Comparando os resultados do presente estudo com os limites propostos por Long *et al.* (1995) em relação aos metais, podemos observar que apenas o Cd na estação 1 mostrou concentração maior que o ERL, onde os efeitos tóxicos são ocasionalmente esperados. Para os demais metais, as concentrações foram abaixo do ERL, mostrando que na Baía de Suape os efeitos tóxicos só são ocasionalmente ou raramente esperados, com relação aos metais.

O Cd pode estar presente nos resíduos de várias indústrias, como, por exemplo, as têxteis, químicas, metalúrgicas, de produção de plástico, de reciclagem e em áreas portuárias (Pandey *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2008). Na área de Suape existem 19 indústrias com potencial para a poluição das águas por Cd, sendo 4 químicas, 5 curtumes, 4 têxteis, 4 metalúrgicas e 2 indústrias de material plástico. Na estação 1, estação próxima ao píer de atracação do porto, a fonte de Cd pode ser devido as dragagens no local (CPRH, 2006).

É possível observar que, durante o período chuvoso no presente estudo, houve um aumento na concentração de metais em relação ao período seco, sendo, provavelmente, devido ao transporte desses contaminantes pelas chuvas. Os metais podem estar sendo transportados das 71 indústrias instaladas no complexo industrial portuário e também de áreas adjacentes, onde é possível observar a presença de usinas de cana de açúcar, destilarias de álcool, indústrias metalúrgicas e têxteis, para a área estuarina próxima a Baía de Suape.

A concentração de HPA total na fração total dos sedimentos coletados na Baía de Suape variou de 31 a 1049 ng.g⁻¹ (Tab. 5.4) no presente estudo. A estação 5 apresentou as maiores concentrações de HPA total em ambos os períodos. Os compostos benzo(b)fluoranteno, fenantreno, fluoranteno, perileno e pyreno foram os mais comuns HPAs em todas as amostras. Benzo(a)antraceno (75,8 ng.g⁻¹), benzo(a)pyreno (53,4 ng.g⁻¹), benzo(b)fluoranteno (86,2 ng.g⁻¹), benzo(e)pyreno (47,6 ng.g⁻¹), criseno (78,7 ng.g⁻¹), fenantreno (46,8 ng.g⁻¹), fluoranteno (152,9 ng.g⁻¹) e pyreno (154,7 ng.g⁻¹) foram os HPAs com as maiores concentrações médias.

A maior concentração de HPA total na estação 5 pode estar correlacionada com a presença de vários barcos de pesca que ficam ancorados nesta área. Apesar disto, a concentração de HPA total no presente estudo ainda é baixa em comparação com outros locais considerados poluídos (Tab. 5.5), e também estão abaixo da concentração de ERL descrita por Long *et al.* (1995). Desta forma, os sedimentos coletados em 2003 na Baía de Suape apresentam baixo potencial de causar efeito biológico adverso, pelo menos no que diz respeito às concentrações de hidrocarbonetos.

Tab. 5.4

Concentrações de HPAs (ng.g⁻¹ peso seco) na fração total das amostras de sedimento (< 2000 µm) da Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por ps) e junho (período chuvoso representado por ps) de 2003 e os limites para metais em sedimentos descritos por Long *et al.* (1995).

HPAs	Baía de Suape										Long <i>et al.</i> (1995)	
	1		2		3		4		5		ERL	ERM
	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc		
Naphthaleno	26.4	12.5	< 0.5	25.1	17.9	< 0.5	20.5	< 0.5	< 0.5	7.3	160	2100
Acenaphthyleno	< 0.5	< 0.5	nd	< 0.5	< 0.5	nd	nd	< 0.5	5.0	7.9	44	640
Acenaphtheno	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	16	500
Fluoreno	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	3.3	19	540
Phenanthreno	5.4	5.6	2.1	6.7	3.8	3.4	2.2	4.3	22.9	46.8	240	1500
Anthraceno	0.9	0.9	< 0.5	1.2	< 0.5	< 0.5	-0.1	0.6	7.2	14.7	85.3	1100
Fluorantheno	6.3	4.3	< 0.5	10.8	2.8	2.1	1.8	3.9	98.3	152.9	600	5100
Pyreno	8.5	7.3	< 0.5	10.1	2.8	2.5	1.1	4.7	94.7	154.7	665	2600
Benzo(a)												
anthraceno	2.5	1.6	< 0.5	3.9	1.0	< 0.5	0.8	0.6	57.8	75.8	261	1600
Chryseno	3.8	2.1	< 0.5	4.3	1.4	0.8	< 0.5	2.3	65.5	78.7	384	2800
Benzo(b)												
fluorantheno	5.0	2.9	< 0.5	4.8	2.1	1.2	1.5	2.4	70.9	86.2		
Benzo(k)												
fluorantheno	1.7	0.8	< 0.5	1.7	1.1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	25.9	29.7		
Benzo(e)pyreno	2.8	1.8	< 0.5	2.8	1.7	< 0.5	< 0.5	1.0	38.3	47.6		
Benzo(a)pyreno	2.6	1.3	< 0.5	3.6	1.1	< 0.5	< 0.5	1.0	44.3	53.4	430	1600
Peryleno	43.9	92.4	10.3	30.9	13.4	15.4	29.1	12.7	16.1	18.7		
Indeno (1.2.3-cd)												
pyreno	3.7	1.9	< 0.5	3.3	1.9	0.8	0.5	1.6	40.9	44.1		
Dibenzo(ah)												
anthraceno	1.1	nd	nd	< 0.5	0.7	nd	nd	0.7	9.2	9.9	63.4	260
Benzo(ghi)												
perylene	2.9	0.8	< 0.5	3.5	2.3	0.9	< 0.5	1.2	34.1	34.6		
16 HPAs												
TOTAL	71	42	2	79	39	12	28	23	577	800		
TOTAL PAHs	219	232	31	150	90	58	120	94	740	1049	4022	44792

ERL – effects range-low e ERM – effects range-median

Tab. 5.5

Concentrações mínimas e máximas de HPA total, hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) e MCNR encontradas em sedimentos coletados na Baía de Suape e em outros locais.

Local	HPA Total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	HTP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	<i>n</i> -alcano total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	MCNR ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Referências
Suape Bay – Northeast Brasil	0,03 – 1,05	1.42- 22.08	0.87-9.61	0.002-8.13	Presente estudo
Kuwait – near-shore	7,43 – 458,6				Metwally <i>et al.</i> (1997)
Santos e Cananéia – Suldeste do Brasil	0,08 – 42,4		1.08-4.29		Nishigima <i>et al.</i> (2001)
Mar Negro - Ucrânia	0.007-0.638	12-166	0.11-2.1	1-232	Readman <i>et al.</i> (2002)
Mar Negro - Rússia	0.061-0.368	4.5-150	0.74-3.4	2.9-140	Readman <i>et al.</i> (2002)
Mar Negro - Turquia	0.014-0.531	5.8-44	1.3-2.6	4-38	Readman <i>et al.</i> (2002)
Porto Cork – Suldeste da Irlanda	0,53 – 2,88				Kilemade <i>et al.</i> (2004)
Canal São Sebastião – Suldeste do Brasil	0,02 – 0,2	0.04-8.53	0.03-4.77	0.17-0.99	Medeiros e Bicego (2004)
Porto Ceuta – Norte da África	496 – 6.972				Guerra-García e García-Gómez (2005)
Rovinj – Croácia	32 – 13.200				Bihari <i>et al.</i> (2005)
Porto Olbia – Itália	0,16 – 0,77				De Luca <i>et al.</i> (2005)
Porto de Ceuta – Norte da África	496 – 6.972				Guerra-García e García-Gómez (2005)
Baía de Meiliang – China	1,2 – 4,8				Qiao <i>et al.</i> (2006)
Porto da Noruega	2.000 – 113.000				Oen <i>et al.</i> (2006)
Sfax, Tunísia, Mar do Mediterrâneo		8.1-1729	2.18- 429.5	31.6-11324	Zaghden <i>et al.</i> (2007)

Lotufo (1997) observou que sedimentos contaminados com óleo diesel, fenantreno e fluoranteno causaram mortalidade ao copépodo *Schizopera knabeni* nas concentrações de 194, 473 e 2100 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, e que o efeito na fecundidade se deu em concentrações mais baixas, 64, 52 e 38 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Estas concentrações, tanto as que causam efeito letal quanto as que causam efeito subletal, estão acima do ERM sugerido por Longe *et al.* (1995) e também bem maiores do que as observadas no presente estudo.

Sedimentos estuarinos e localizados no infralitoral normalmente apresentam concentrações de hidrocarbonetos alifáticos na faixa de $10\mu\text{g.g}^{-1}$, embora este valor possa ser de 2 a 3 ordens de magnitudes maior quando há uma entrada significativa de n-alcanos proveniente de plantas terrestre (Volkman *et al.*, 1992). Baseados nesses valores e nos valores da Tab. 5.6, a concentração de hidrocarbonetos alifáticos observadas no presente estudo que variou de 1,42 a 22,10 $\mu\text{g.g}^{-1}$ é indicativa de uma área estuarina, onde há uma entrada de matéria orgânica proveniente dos manguezais.

A contribuição de fontes antropogênicas e naturais de hidrocarbonetos pode ser avaliada pela composição detalhada de hidrocarbonetos alifáticos, a saber os n-alcanos, isoprenóides (pristano e fitano) e a mistura complexa não resolvida (MCNR). Os n-alcanos estão presentes em baixa concentração (0,87 a 9,61 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Nas estações 1 e 3, em ambos os períodos, e na estação 4 no período chuvoso não foi observado predominância de ímpares sobre pares. Mas, as estações 5 (ambos os períodos), 4 (período seco) e 2 (período chuvoso) foram caracterizadas por uma forte predominância de ímpares sobre pares (Fig. 5.4), indicando haver origem terrestre, de plantas superiores, como observado também por Nishigima *et al.* (2001) e Readman *et al.* (2002).

O pristano é normalmente encontrado no zooplâncton e outros animais marinhos superiores, enquanto que o fitano é reportado como um componente normal do óleo, mas também pode ocorrer como resultado do processo diagenético. Em sedimentos não contaminados com óleo, a relação pristano/fitano é maior que 1, normalmente entre 3 e 5 (Readman *et al.*, 2002). Na Baía de Suape, valores próximos de 1 foram observados nas estações 2, 3, 4 e 5; indicando uma predominância de entradas de hidrocarbonetos petrogênico (Tab. 5.6).

A presença de uma elevação na coluna do capilar GC indica a presença de uma mistura complexa não resolvida e é geralmente relacionada com a presença de resíduos de petróleo degradado ou intemperizado (Readman *et al.*, 2002). A concentração absoluta da MCNR ou, alternativamente, sua importância relativa expressa como a razão dos compostos não resolvido com os resolvidos (MCNR/HR) são normalmente utilizadas como critério diagnóstico de entrada de poluentes, quando os valores de MCNR/HR > 4 confirma

a presença generalizada de importantes resíduos relacionados com petróleo (Readman *et al.*, 2002). Na Baía de Suape a concentração de MCNR variou de 0,002 a 8,127 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e o índice MCNR/HR foram, em todas as amostras, abaixo de 4 (Tab. 5.6) indicando baixa contribuição de hidrocarbonetos de petróleo nos sedimentos estudados.

Tab. 5.6

Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e parâmetros relacionados com amostras de sedimento total (< 2000 μm) para a Baía de Suape durante os meses de fevereiro (período seco representado por ps) e junho (período chuvoso representado por pc) coletados no ano de 2003.

Hidrocarbonetos	Suape Bay									
	1		2		3		4		5	
	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc
Pr	0.059	0.033	0.024	0.022	0.022	0.02	0.026	0.016	0.013	0.043
Fi	0.004	0.002	0.002	0.049	0.002	0.06	0.082	0.062	0.048	0.097
$\Sigma n\text{-alc}$	5.586	5.207	0.911	1.126	4.24	4.249	9.614	7.231	0.866	2.131
$\Sigma(\text{C}_{14}\text{--}\text{C}_{20})$	0.272	0.268	0.125	0.175	0.459	0.457	0.294	0.404	0.201	0.334
$\Sigma(\text{C}_{21}\text{--}\text{C}_{34})$	5.318	4.944	0.790	0.951	3.786	3.795	9.323	6.829	0.666	1.798
HRP	13.95	8.894	1.421	2.613	6.345	6.535	10.284	11.486	1.432	3.231
MCNR	8.127	7.219	0.002	0.002	0.002	0.002	5.378	5.654	3.5	5.422
HTP	22.076	16.114	1.421	2.613	6.345	6.535	15.662	17.14	4.932	8.652
Pr/Ph	14.75	16.5	12	0.449	11	0.333	0.317	0.258	0.241	0.443
U/R	0.583	0.812	0.001	0.001	0.000	0.000	0.523	0.492	2.444	1.678

Pr = Pristano; Fi = Fitano; $\Sigma n\text{-alc}$ = concentração total de n -alcanos; HRP = hidrocarbonetos resolvidos de petróleo; MCNR = mistura complexa não resolvida; HTP = hidrocarbonetos totais de petróleo; $\Sigma(\text{C}_{14}\text{--}\text{C}_{20})$ = somatório das concentrações de n -alcanos da faixa de C_{14} a C_{20} ; $\Sigma(\text{C}_{21}\text{--}\text{C}_{34})$ = somatório das concentrações de n -alcanos da faixa de C_{21} a C_{34} .

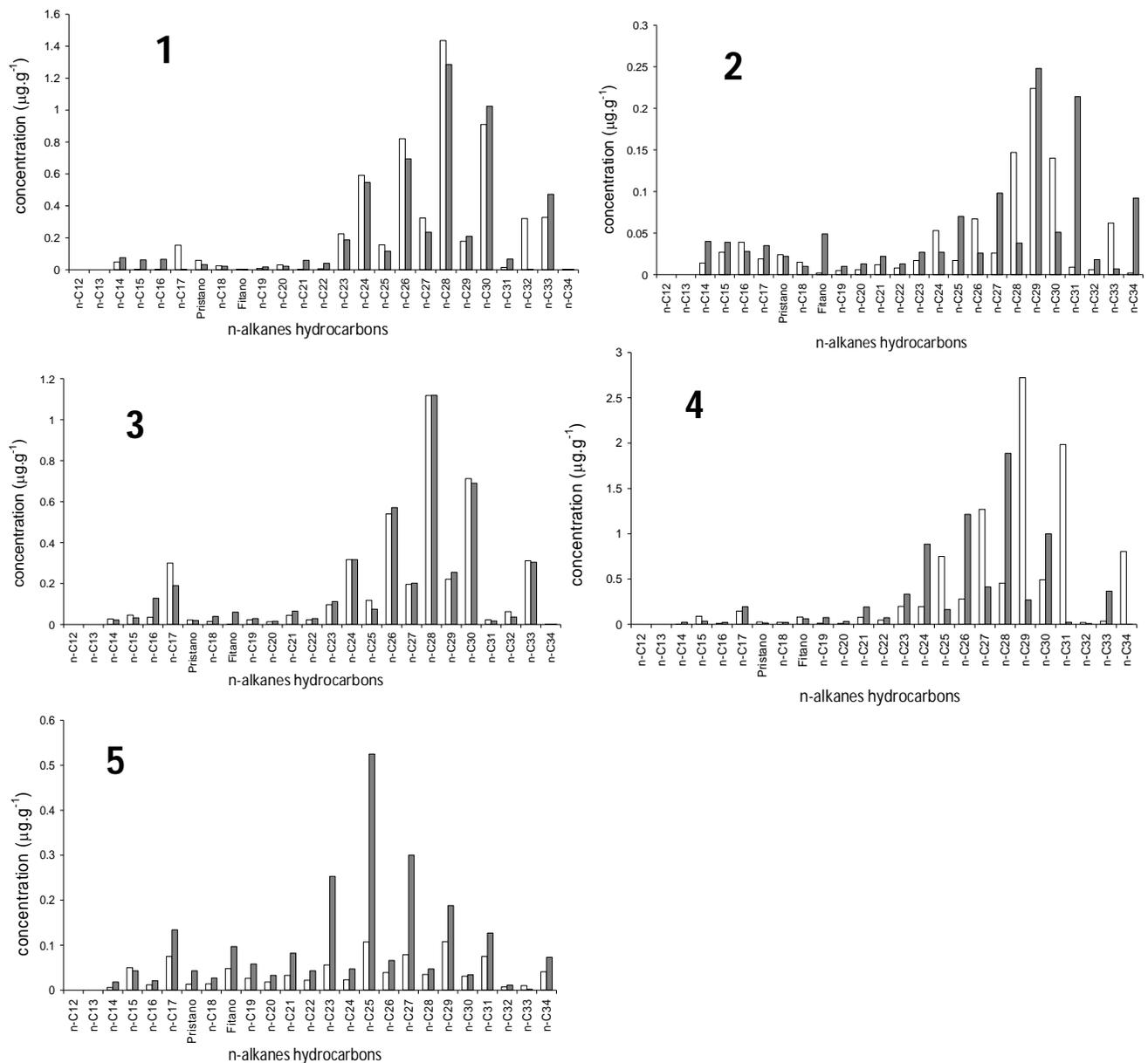


Fig. 5.4 – Concentrações dos n-Alcanos (n-C₁₂ a n-C₃₄), pristano e fitano nos sedimentos coletados na Baía de Suape nas estações 1, 2, 3, 4 e 5 nos meses de fevereiro (período seco) (□) e junho (período chuvoso) (■) no ano de 2003.

As análises de correlação detectaram correlações significativas entre o efeito letal e Σn -alcanos (Pearson, $n = 10$; $p = 0,0204$; $R^2 = 0,5095$) e entre efeito letal e $\Sigma(C_{21}-C_{34})$ (Pearson, $n = 10$, $p = 0.0181$, $R^2 = 0,5229$). De acordo com esses resultados, o *T. biminiensis* pode ser sensível ao óleo fresco e presença de homólogos de cadeia longa.

Hagopian-Schlekat *et al.* (2001) reportaram que o efeito aditivo de cinco metais (Cd, Cu, Ni, Pb e Zn) foi 1,4 vez mais tóxico do que o efeito aditivo esperado na sobrevivência de *Amphiascus tenuiremis*. Portanto, podemos inferir que, poluentes em baixas concentrações no ambiente podem representar risco quando o efeito aditivo é considerado.

Este estudo indica que a Baía de Suape foi, em 2003, uma área com baixo potencial para causar efeito biológico adverso em relação a HPA e metais pesados. A mortalidade na estação 4 durante o período seco pode estar relacionado com Σn -alcanos e $\Sigma(C_{21}-C_{34})$, embora esta área tenha sido considerada como não poluída a moderadamente poluída em relação aos hidrocarbonetos alifáticos. Contudo, devido a várias indústrias e ao histórico de contaminação no rio Massangana, outros contaminantes não estudados também podem estar influenciando a toxicidade no presente estudo. O copépodo *T. biminiensis* parece ser um organismo promissor a ser utilizado em bioensaios com sedimento estuarino ou marinho. Para um estudo mais completo, outros parâmetros podem ser considerados em estudos futuros, como por exemplo, o desenvolvimento dos náuplios para o estágio de copepoditos.

6. Capítulo III

Avaliação da toxicidade dos sedimentos coletados no período de abril de 2005 a janeiro de 2006 no entorno do Complexo Industrial Portuário de Suape (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo *Tisbe biminiensis*

6.1 RESUMO

A toxicidade do sedimento do Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), localizado a 40 Km ao sul da cidade do Recife (Pernambuco, Brasil), foi avaliada utilizando o copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis*. Efeito letal (mortalidade) e subletal (fecundidade, número de náuplios e copepoditos) foram avaliados em duas regiões do CIPS, no Porto Interno de Suape (Suape) e no estuário do rio Ipojuca (Ipojuca). Foram determinados 4 pontos de coleta em Suape e 5 no Ipojuca, durante o período de abril de 2005 e janeiro de 2006 foram realizadas 4 saídas de campo para cada uma das áreas, com periodicidade de 3 meses e intervalo de 15 dias entre uma área e outra. O sedimento controle foi coletado no estuário do rio Maracaípe. Análises de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos foram realizados. Não foi observado efeito letal em nenhum ponto do CIPS, porém, efeito subletal foi observado em todos os pontos de coleta. A toxicidade crônica apresentou-se mais crítica nas coletas realizadas em julho no PIS e em agosto no ERI, sugerindo que o contaminante capaz de causar efeito tóxico para *T. biminiensis* pode estar sendo carregado pelas chuvas através dos rios que deságuam no CIPS. Os valores de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos mostraram-se em baixas concentrações. Não foram encontradas correlações significativas entre a toxicidade e os metais pesados ou hidrocarbonetos.

6.2 INTRODUÇÃO

Após o primeiro ano de coleta de sedimento em Suape (descrito no Capítulo II desta tese) para avaliação da toxicidade do sedimento utilizando *T. biminiensis* várias informações foram conseguidas com relação a estocagem do sedimento, ao tamanho da malha utilizada para peneiramento do sedimento, sobre o peneiramento no final do experimento para avaliação da sobrevivência, sobre os efeitos observados além da avaliação da condição do sedimento do porto interno de Suape.

Com relação ao armazenamento do sedimento, o mesmo deve ser evitado, e caso não seja possível a realização do experimento logo após a coleta, que o período de armazenamento não ultrapasse 7 dias, como é indicado no ASTM (2008). No Capítulo II, pode-se observar que os experimentos realizados com sedimento armazenado por período de 11 dias ainda apresentaram diferenças significativas em relação aos que não foram armazenados. Por isso, os experimentos realizados neste capítulo e no seguinte, não o sedimento não foi armazenado.

No capítulo anterior o sedimento foi peneirado, no primeiro experimento durante o período seco (fevereiro/2003), utilizando-se uma malha de 125 μm de abertura, e no final do experimento, antes de ocorrer a fixação do material, todo o conteúdo dos recipientes foi passado pela mesma peneira. Este procedimento foi adotado para verificar a sobrevivência das fêmeas adultas, porém, devido à baixa fecundidade ocorrida nos experimentos realizados neste período o tamanho da malha foi modificado para 100 μm nos experimentos realizados no período chuvoso (junho/2003) para evitar a perda dos náuplios recém eclodidos. Este procedimento teve bons resultados, porém, após medir alguns náuplios, verificou-se que os mesmos apresentavam um tamanho de cerca de 80 μm , desta forma, padronizou-se um tamanho de malha de 63 μm para todos os experimentos.

Outra forma de minimizar a perda dos náuplios foi evitar o peneiramento no final do experimento, e com isso, a análise da sobrevivência das fêmeas adultas ocorreu através da observação da coloração das mesmas utilizando o corante Rosa de Bengala, ou seja, as fêmeas que apresentavam coloração rosa claro ou aquelas que não foram coradas ou desapareceram foram consideradas mortas no final do experimento.

Com um período de incubação de 7 dias, que foi o período dos experimentos utilizando *T. biminiensis*, os náuplios nascidos da primeira desova das fêmeas utilizadas no experimento teriam tempo para se desenvolver até copepoditos. Desta forma, o desenvolvimento de náuplios para copepoditos, que foi representado pelo número de copepoditos no final do experimento, foi inserido como parâmetro a ser analisado nos capítulos subseqüentes ao anterior.

Considerando a qualidade do sedimento coletado no porto interno de Suape, observou-se, no capítulo anterior, que apenas o ponto localizado no rio Massangana durante o período seco (fevereiro/2003) apresentou efeito letal. Por isso, se fez necessário mais um ano de coleta na área, com duas coletas no período chuvoso e mais duas no período seco. Devido a importância do rio Ipojuca em termos de possíveis contaminantes para a área de Suape, as coletas foram ampliadas para esta área, onde foram fixados 5 pontos. Desta forma, pode-se comparar o porto interno de Suape e a área estuarina do rio Ipojuca.

Após estas considerações, o presente capítulo teve como objetivo analisar a toxicidade dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e também no estuário do rio Ipojuca localizados no entorno do Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS) no litoral sul do estado de Pernambuco, utilizando parâmetros letais e subletais com o copépodo *T. biminiensis*, bem como correlacionar os dados biológicos com as concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Área de estudo

O clima de Suape é tropical, quente e úmido, com temperatura média anual de 24°C e precipitação média de 1.500 – 2.000 mm.ano⁻¹, sendo mais concentrada nos meses de março a agosto. A umidade é normalmente superior a 80%, e os ventos são geralmente de sudeste. O regime de salinidade é de mesoalino a limnético nas áreas onde há maior influência dos rios, com maiores valores nas marés altas (Neumann-Leitão e Matsumura-Tundisi, 1998).

Dos rios que possuem sua foz em Suape e que transportam contaminantes, o Ipojuca é o de maior importância, com cargas orgânicas e tóxicas elevadas. A bacia do rio Ipojuca drena as regiões do Sertão, Agreste, Zona da Mata e Região Metropolitana do Estado de Pernambuco, destacando-se o Agreste como o maior contribuinte de carga orgânica doméstica (84,2%). Além da carga orgânica, 102 indústrias instaladas ao longo da bacia do rio Ipojuca também contribuem com lançamentos de possíveis contaminantes que poderão vir a acumular-se no sedimento (CPRH, 2003; Fernandes, 1999).

Com o barramento dos aportes do rio Ipojuca devido à instalação do Complexo Industrial de Suape, os rios Massangana e Tatuoca apresentaram uma diminuição no seu nível de fertilização, uma vez que o Ipojuca era o rio que mais contribuía para toda a área. A principal fonte de fertilização do Rio Massangana depende dos aportes dos rios formadores tais como Tabatinga (que circula a oeste da área destinada à refinaria) e Algodois, e da matéria orgânica produzida dentro das áreas de manguezais localizadas

no estuário. O rio Tatuoca se origina a partir de descargas subsuperficiais e que durante o período mais chuvoso chegam a aflorar em pontos difusos localizados na área da refinaria. A foz deste rio tem sofrido intervenções de dragagens na sua calha e aterros parciais ao longo de suas margens (FADE, 2006).

As coletas de sedimento foram realizadas em maré de sizígia durante a baixa-mar em duas regiões do CIPS, no Porto Interno de Suape (que será referido como Suape) e no estuário do rio Ipojuca (que será referido como Ipojuca). As coletas nessas duas áreas não puderam ser realizadas no mesmo dia, por isso, primeiro foi realizada a coleta em Suape, e 15 dias depois no Ipojuca. Em Suape foram determinados 4 pontos de coleta, enquanto que no Ipojuca, foram 5 pontos (Fig. 6.1). O período de coleta foi de abril de 2005 a janeiro de 2006, com intervalos de 3 meses entre as coletas, sendo dois meses durante o período chuvoso (abril e julho em Suape, e abril e agosto no Ipojuca) e em dois meses do período seco (outubro/2005 e janeiro/2006). Para a realização da coleta, foi utilizado barco, para chegar até os pontos de coleta, uma draga do tipo Van veen, para a coleta do sedimento, e um GPS para a determinação dos pontos de coleta. Em cada ponto foram coletadas 3 réplicas amostrais para avaliar a variabilidade espacial. As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro descontaminados e colocadas em isopor contendo gelo. Devido a pouca profundidade (< 1m) dos locais de coleta, as medições de OD, pH, temperatura (°C) e salinidade foram obtidas da água superficial em cada ponto, a fim de caracterizar inicialmente o ambiente.

Em laboratório, o sedimento coletado foi peneirado utilizando uma malha de 63 µm para remoção de possíveis predadores, sendo utilizada, quando necessária, uma pequena quantidade de água do local de coleta. Após o peneiramento, a fração fina era devolvida para seus recipientes de vidro previamente lavados com água destilada, e levada à geladeira a 4°C por cerca de 16 h, após este período foi realizada a remoção do sobrenadante.

6.3.2 Bioensaio com o *T. biminiensis*

O método para a realização do bioensaio com *T. biminiensis* está descrito nos Capítulos I e II, porém, como foi discutido na introdução, o tamanho da malha utilizada foi de 63 µm. Os parâmetros analisados neste capítulo foram mortalidade (como efeito letal), fecundidade (náuplios + copepoditos), números de náuplios e número de copepoditos (como efeito subletal).

Testes de referência com dicromato de potássio foram realizados paralelamente ao experimento para avaliar a susceptibilidade do lote de copépodos utilizados. A CL₅₀-96h foi calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

6.3.3 Análises físico-químicas do sedimento do CIPS

As coletas de sedimento para as análises geoquímicas foram realizadas no mesmo momento das coletas para o bioensaio, e consistiram de uma amostra composta, ou seja, cerca de 60 g de sedimento de cada uma das três amostras em cada ponto foram homogeneizados e armazenados em frascos de vidro e acondicionados em caixa térmica com gelo até a chegada em laboratório.

As análises granulométricas e a determinação da matéria orgânica foram realizadas como descrito no Capítulo II. Os metais pesados e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foram analisados na fração fina do sedimento ($< 63\mu\text{m}$).

Os metais pesados foram quantificados no Laboratório de Ciências Ambientais no Centro de Ciências Biológicas da UENF e fizeram parte de uma monografia defendida por Silva Junior (2008).

O protocolo de extração para hidrocarbonetos foi baseado no método da EPA 3540C, como descrito no Capítulo II, e realizado no Laboratório de Geoquímica Orgânica Marinha do Depto. de Oceanografia da UERJ.

6.3.4 Análises estatísticas

Para a identificação de diferenças significativas dos parâmetros letal e subletais entre os pontos de amostragem foi utilizada a ANOVA, após a verificação da normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, sendo o nível de significância igual a 0,05. Quando se detectou diferenças, o teste de Tukey foi usado para comparar as médias, aos pares.

Devido a problemas técnicos, as análises de HPA e metais pesados não foram realizadas em todas as amostras de sedimento. Desta forma, as análises de correlação de Pearson foram realizadas apenas com os resultados toxicológicos que coincidiam com as amostras analisadas para HPA e metais pesados.

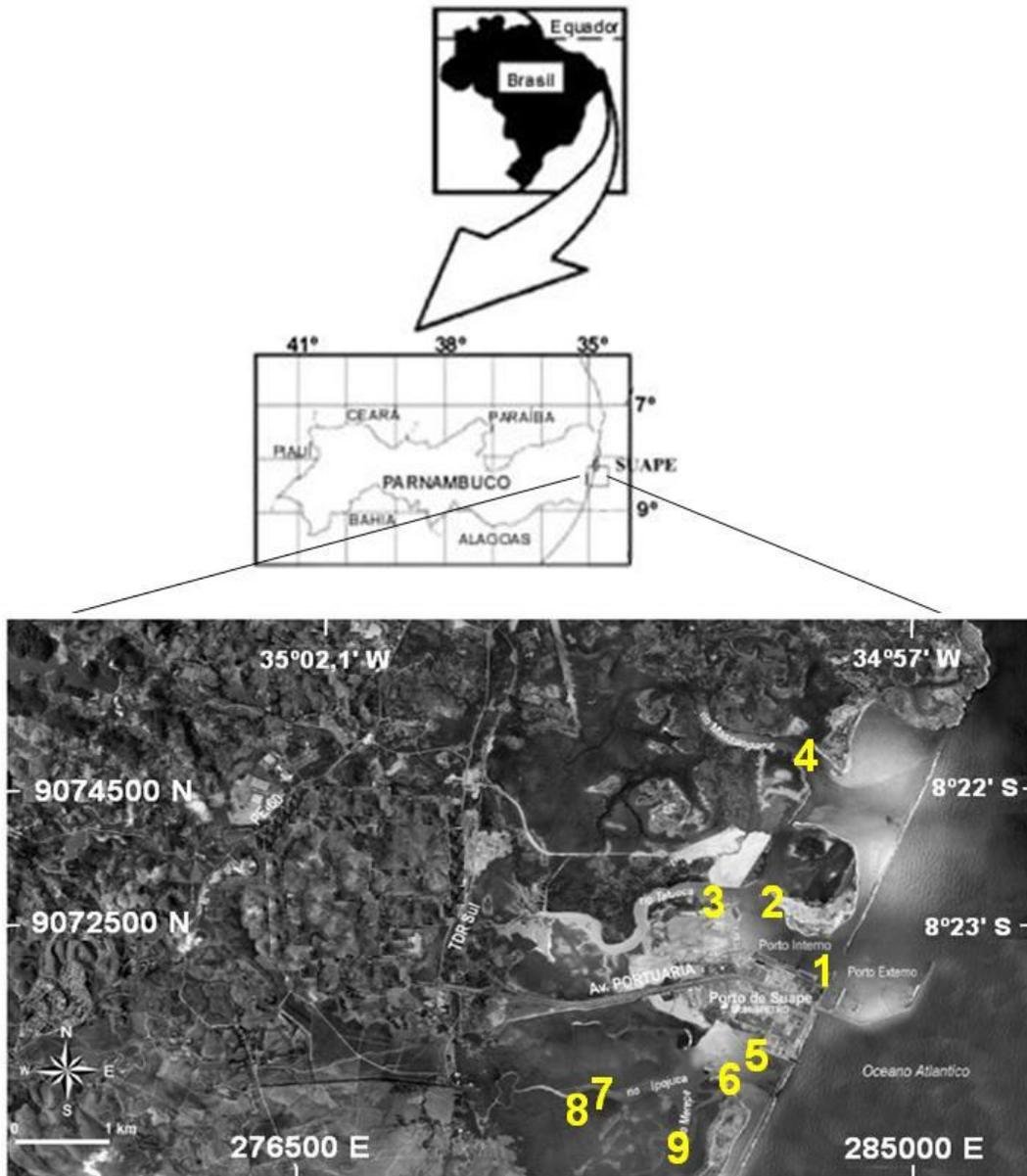


Fig. 6.1 – Mapa adaptado de FADE (2006) com a área estudada e os pontos de coleta nas áreas do Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca, ambos localizados no Complexo Industrial Portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. 1 – cais de atracção do Porto de Suape, 2 – próximo a ilha Cocaia, 3 – na desembocadura do rio Tatuoca, 4 – na desembocadura do rio Massangana, 5 – em frente a termoeletrica de Pernambuco, 6 – próximo a desembocadura do rio Merepe, 7 – rio Ipojuca, 8 – rio Ipojuca e 9 – rio Merepe.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Parâmetros hidrológicos dos pontos de coleta

Os dados de pH, OD, salinidade e temperatura estão na Tab. 6.1. Os valores de pH apresentaram pouca variação com relação aos pontos e períodos de coleta, com mínimo de 6,95 e máximo de 8,26. De modo geral, o OD apresentou maiores valores durante o mês de julho/agosto. Com relação as áreas de coleta, Suape mostrou valores mais elevados de OD em relação ao Ipojuca. O OD variou de 2,5 mg.L⁻¹, no mês de outubro no ponto 7, a 8 mg.L⁻¹, no mês de julho no ponto 1. A salinidade também apresentou variação durante o mês de julho/agosto, principalmente no Ipojuca, com valores chegando a 0. Com exceção do ponto 4, não houve grande diminuição da salinidade em Suape durante o mês de julho. A temperatura da água variou de 25 a 31°C, com os menores valores ocorrendo no mês de julho/agosto.

6.4.2 Bioensaio com o copépodo *T. biminiensis*

A sobrevivência não variou significativamente em nenhuma das áreas de coleta, seja em relação aos pontos ou meses de coleta, não havendo efeito letal ao *Tisbe biminiensis* (Fig. 6.3 e Tab. 6.2).

Quanto aos efeitos subletais, observa-se uma variação ao longo dos meses amostrados, sendo o mês de julho/agosto o mais crítico, apresentando efeitos em todos os pontos em Suape e em Ipojuca (Fig. 6.3 e Tab. 6.3, 6.4 e 6.5).

A fecundidade apresentou diferença significativa nos meses de julho em Suape (ANOVA, $F = 18,433$; $p < 0,0001$), agosto em Ipojuca (ANOVA, $F = 6,958$; $p = 0,0023$) e janeiro em Suape (ANOVA, $F = 8,880$; $p = 0,0014$). De acordo com teste de Tukey, todos os pontos coletados no mês de julho em Suape apresentaram fecundidade significativamente inferior em relação ao controle. No mês de agosto, no Ipojuca, foram os pontos 5, 7, 8 e 9 que apresentaram fecundidade significativamente inferior em relação ao controle. E em janeiro, em Suape, a fecundidade nos pontos 1, 2 e 3 foram significativamente inferior ao controle (Fig. 6.3 e Tab. 6.3).

Com relação ao número de náuplios produzidos ao final do experimento, diferenças significativas foram observadas nos meses de julho em Suape (ANOVA, $F = 4,315$; $p = 0,0216$), agosto no Ipojuca (ANOVA, $F = 5,471$; $p = 0,0063$) e janeiro em Suape (ANOVA, $F = 3,475$; $p = 0,0419$). O teste de tukey mostrou um decréscimo significativo no número de náuplios em relação ao controle nos pontos 2 e 9 no mês de julho/agosto, e no ponto 1 no mês de janeiro (Fig. 6.3 e Tab. 6.4).

Efeitos no desenvolvimento, representado pelo número de copepoditos, foram observados em todos os pontos de coleta, variando em relação ao período da coleta. Em

abril diferenças significativas foram observadas em Suape (ANOVA, $F = 12,381$; $p = 0,0003$) e no ERI (ANOVA, $F = 3,061$; $p = 0,0450$). Em julho/agosto todos os pontos, em Suape (ANOVA, $F = 4,315$; $p = 0,0216$) e no Ipojuca (ANOVA, $F = 5,471$; $p = 0,0063$) apresentaram diferenças significativas. Em outubro, diferenças significativas (ANOVA, $F = 12,759$; $p = 0,0001$) foram observadas apenas no Ipojuca. Em janeiro, apenas em Suape houve diferença significativa (ANOVA, $F = 5,238$; $p = 0,0112$) (Fig. 6.3 e Tab. 6.5).

6.4.3 Características geoquímicas do sedimento

O percentual de matéria orgânica (M.O.) no sedimento variou de 2,4 a 24,3%. Os maiores percentuais de M.O. foram observados nos pontos 1, 3, 4, 7 e 8, os demais pontos apresentaram percentual inferior a 8. Com relação a granulometria, os sedimentos de Suape e do Ipojuca consistem em sua maior parte de areia, o percentual de silte+argila ($< 63\mu\text{m}$) em todos os pontos amostrados foi inferior a 25%. Os pontos com maior percentual de silte+argila foram 1, 2, 3, 6, 7 e 8 (Tab. 6.6).

As concentrações de metais pesados nos sedimentos coletados em Suape e em Ipojuca podem ser observados na Tab. 6.6. Os pontos 7 e 8 apresentaram as maiores concentrações dos metais analisados no presente estudo em relação aos demais pontos de coleta, o ponto 4 apresentou as menores concentrações para os metais Mn e Zn, o ponto 5 para Cr, Fe e Al e o ponto para Cu e V. Se comprarmos a concentração de metais entre as duas áreas avaliadas (Suape e Ipojuca), podemos observar que o estuário do rio Ipojuca apresenta concentrações de metais mais elevadas do que em relação ao Porto Interno de Suape, para todos os metais analisados com exceção do V. Considerando o período de coleta, é possível observar que em Suape há um incremento na concentração de todos os metais analisados no período seco em relação ao chuvoso. O mesmo se observa na área do Ipojuca para o Cr, V e Zn.

Com relação aos hidrocarbonetos alifáticos, as maiores concentrações de Pristano, Fitano, n-alcanos, hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP), MCNR e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram observadas no controle (Tab. 6.7). Embora os valores do controle apontem um elevado aporte de entrada de hidrocarbonetos, a relação MCNR/HRP foi a mais baixa encontrada, assim como a relação entre %MCNR/Alif-total. O IPC (Índice de Preferência por Carbono) é um índice da presença de n-alcanos biologicamente sintetizados e indica a contribuição relativa de n-alcanos de fontes natural ($\text{IPC} > 1$) e de fontes antropogênicas ($\text{IPC} \approx 1$). De acordo com os valores de IPC, os n-alcanos de todos os pontos apresentam fonte natural. Quando comparamos os períodos de coleta, observa-se que há um aumento na concentração dos Alif totais no período seco.

Já em relação às áreas de coleta, o estuário do rio Ipojuca possui uma concentração maior de hidrocarbonetos alifáticos do que na área do Porto Interno de Suape.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) dos sedimentos do Porto Interno de Suape e dos estuários dos rios Ipojuca e Maracaípe (controle) estão na Tab. 6.8. A concentração total de HPA variou de 44,9 (controle) a 701,6 ng.g⁻¹ (ponto 7). Os pontos 7, 8 e 9 apresentaram as maiores concentrações de HPAs. Os compostos fenantreno, fluoranteno, pireno e perileno foram os HPAs mais comuns em todas as amostras. Com relação às áreas de coleta, podemos verificar que o estuário do rio Ipojuca possui valores mais elevados de HPA (total e os 16 prioritários) em relação ao porto interno de Suape. Se comprarmos os períodos de coleta, podemos observar que em Suape as maiores concentrações de HPA (total e os 16 prioritários) ocorreram nas coletas realizadas no período seco. Já no estuário do rio Ipojuca, o contrário foi observado, com concentrações superiores ocorrendo no período chuvoso.

6.4.4 Análises de correlação

Devido à problemas com o transporte das amostras, onde algumas delas foram perdidas, não foi possível ter resultados de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos para todos os meses e estações de coleta. Desta forma, para a análise de correlação, alguns valores toxicológicos foram retirados. Já para os hidrocarbonetos alifáticos, foi possível realizar a análise de correlação com todos os pontos e períodos de coleta.

Após a realização das análises, verificou-se que não houve correlação significativa entre os efeitos tóxicos apresentados pelo copépodo *T. biminiensis* e metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos e/ou alifáticos.

Tab. 6.1 – Valores de pH, oxigênio dissolvido (OD), salinidade e temperatura da água, medidos em cada ponto de coleta do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca no período de abril de 2005 a janeiro de 2006.

Pontos de coleta	Parâmetros de Campo																
	coordenadas (SAD 69)	pH				OD (mg.L ⁻¹)				Salinidade (‰)				Temperatura (°C)			
		abril	julho/ agosto	outubro	janeiro	abril	julho/ agosto	outubro	janeiro	abril	julho/ agosto	outubro	janeiro	abril	julho/ agosto	outubro	janeiro
1	S 08°23'08,3" W 034°58'14,8"	8,22	8,26	8,29	8,24	5,2	8	6,6	7,3	37	35	35	37	28	29	30	
2	S 08°22'47,6" W 34°57'58,6"	8,05	8,24	8,16	8,06	4,6	6,7	5,6	6	35	33	35	35	29	29	30	
3	S 8°22'56,1" W 34°58'48,1"	8,05	7,94	7,98	7,57	5,3	6,7	5,3	5,7	30	36	37	35	28	29	30	
4	S 08°21'36,9" W 34°57'46,2"	8,14	7,61	7,56	7,16	5,4	6	4,8	7,2	35	20	20	32	29	30	30	
5	S 08°24'32" W 034°58'36"	8,22	7,74	8,15	8,16	5,7	7,7	6,1	6	35	8	15	35	30	26	30	29
6	S 08°24'31,0" W 34°58'34,2"	7,84	7,69	7,71	8,07	5,3	6,4	4,5	5,4	31	3	15	32	31	27	30	29
7	S 8°24'37,8" W 34°59'02",7	7,3	7,41	6,91	6,95	4,3	7,2	2,5	4,1	19	0	7	16	30	26	31	30
8	S 08°25'04,7" W 34°58'55,6"	7,38	7,47	7,09	7,11	4,4	5,8	3,5	4,1	17	0	6	18	30	25	29	31
9	S 08°25'04,7" W 34°58'54,3"	7,51	7,45	7,46	7,38	4,3	5,7	3,8	4,1	27	5	20	27	30	27	29	30

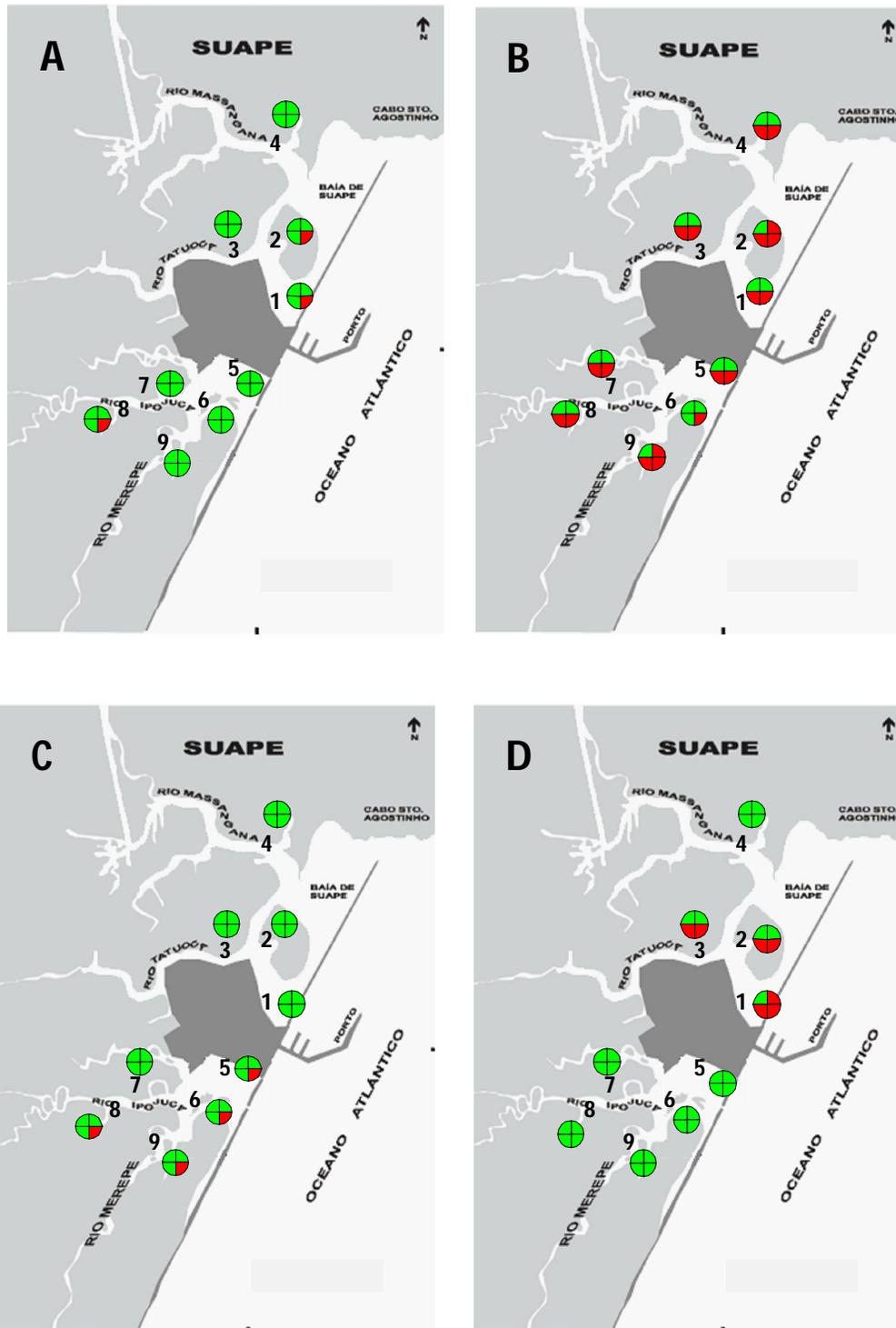


Fig. 6.2 – Efeitos letal e subletal dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos meses de abril (A), julho/Agosto (B), outubro (C) e janeiro (D) utilizando como organismo teste o copépodo *Tisbe biminiensis*. A cor verde significa que não houve efeito tóxico, e a cor vermelha significa que houve efeito tóxico em relação ao controle.

Tab. 6.2 – Média (\pm desvio padrão) da sobrevivência de *Tisbe biminiensis* ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006.

		Período de coleta			
		abril	Julho/agosto	outubro	janeiro
Porto Interno de Suape	Cont 1	88 \pm 8	96 \pm 5	96 \pm 5	85 \pm 6
	1	86 \pm 10	97 \pm 3	91 \pm 8	83 \pm 10
	2	71 \pm 23	94 \pm 2	87 = 7	82 \pm 5
	3	87 \pm 6	89 \pm 5	93 \pm 3	84 \pm 4
	4	80 \pm 9	88 \pm 5	89 \pm 7	86 \pm 11
	Estatística	F = 1,056 p = 0,4193	F = 2,650 p = 0,0855	F = 1,969 p = 0,1636	F = 0,194 p = 0,9368
Estuário do Rio Ipojuca	Cont 2	92 \pm 13	95 \pm 10	94 \pm 9	82 \pm 19
	5	90 \pm 3	99 \pm 2	89 \pm 2	93 \pm 6
	6	96 \pm 2	97 \pm 3	88 \pm 13	91 \pm 5
	7	97 \pm 0	93 \pm 3	87 \pm 9	83 \pm 0
	8	98 \pm 2	98 \pm 2	81 \pm 17	84 \pm 10
	9	94 \pm 7	92 \pm 8	87 \pm 6	90 \pm 0
	Estatística	H = 4,732 p = 0,4494	F = 0,526 p = 0,7528	F = 0,655 p = 0,6626	F = 0,593 p = 0,7059

Tab. 6.3 – Média (\pm desvio padrão) da fecundidade de *Tisbe biminiensis* ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.

		Período de coleta			
		abril	Julho/agosto	outubro	janeiro
Porto Interno de Suape	Cont 1	564,4 \pm 148	660,2 \pm 82,8	138 \pm 46,5	427,6 \pm 59,7
	1	527,1 \pm 31,4	325,2 \pm 45,4 *	122 \pm 16,2	192,8 \pm 75,6 *
	2	389,7 \pm 182	344,3 \pm 54,1 *	156,4 \pm 34,5	212,6 \pm 92,2 *
	3	478,0 \pm 25,6	372 \pm 81,3 *	152,2 \pm 5,4	224,7 \pm 60,1 *
	4	632 \pm 93,3	420 \pm 29,7 *	132 \pm 12,5	345,6 \pm 49,2
	Estatística	F = 1,781 p = 0,1974	F = 18,433 p < 0,0001	F = 0,400 p = 0,8052	F = 8,880 p = 0,0014
Estuário do Rio Ipojuca	Cont 2	570,2 \pm 38,8	688,5 \pm 168,2	168,8 \pm 24,1	314,8 \pm 69,0
	5	508,3 \pm 95,1	385,8 \pm 77,9 *	225,2 \pm 9,2	438,8 \pm 43,5
	6	486,8 \pm 59,9	473,0 \pm 26,1	196,8 \pm 56,7	382,3 \pm 18,7
	7	436,2 \pm 69,6	409,0 \pm 47,8 *	158,1 \pm 17,9	328,2 \pm 51,5
	8	522,7 \pm 106,9	390,9 \pm 33,3 *	132,9 \pm 29,3	399,8 \pm 33,4
	9	473,4 \pm 83,9	257,9 \pm 127,0 *	140,7 \pm 17,3	350,9 \pm 62,5
	Estatística	F = 1,450 p = 0,2672	F = 6,958 p = 0,0023	F = 4,346 p = 0,0135	F = 2,743 p = 0,0625

Tab. 6.4 – Número médio (\pm desvio padrão) de náuplios de *Tisbe biminiensis* ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.

		Período de coleta			
		abril	Julho/agosto	outubro	janeiro
Porto Interno de Suape	Cont 1	240,4 \pm 97,7	427,4 \pm 61,5	136,8 \pm 45,6	346,6 \pm 64,1
	1	422,1 \pm 72,9	302,1 \pm 44,0	121,9 \pm 16,1	191,1 \pm 75,5 *
	2	310,5 \pm 146,3	301,2 \pm 51,8 *	156,3 \pm 34,6	203,0 \pm 92,0
	3	271,7 \pm 75,8	303,9 \pm 62,6	149,9 \pm 8,6	7216,7 \pm 59,3
	4	333,0 \pm 56,3	335,9 \pm 38,2	132,7 \pm 12,5	297,3 \pm 69,
	Estatística	F = 1,857 p = 0,1829	F = 4,315 p = 0,0216	F = 0,406 p = 0,8009	F = 3,475 p = 0,0419
Estuário do Rio Ipojuca	Cont 2	467,8 \pm 76,4	511,3 \pm 84,8	111,0 \pm 18,8	306,4 \pm 69,5
	5	488,9 \pm 95,2	429,7 \pm 22,8	203,3 \pm 11,7	368,9 \pm 44,3
	6	462,3 \pm 45,7	466,4 \pm 27,9	180,4 \pm 67,5	369,1 \pm 21,8
	7	399,8 \pm 83,5	401,9 \pm 47,3	120,6 \pm 27,5	325,0 \pm 48,1
	8	518,2 \pm 108,2	386,2 \pm 30,1	104,1 \pm 26,1	382,8 \pm 40,7
	9	456,1 \pm 76,2	252,9 \pm 122,7 *	124,7 \pm 12,7	295,1 \pm 90,0
Estatística	F = 0,688 p = 0,6404	F = 5,471 p = 0,0063	F = 5,350 p = 0,0059	F = 1,320 p = 0,3115	

Tab. 6.5 – Número médio (\pm desvio padrão) de copepoditos de *Tisbe biminiensis* ao final de uma semana quando expostos ao sedimento do Porto Interno de Suape e do estuário do rio Ipojuca coletados no período de abril/2005 a janeiro/2006. * representa valor significativamente diferente em relação ao controle.

		Período de coleta			
		abril	Julho/agosto	outubro	janeiro
Porto Interno de Suape	Cont 1	324,0 \pm 57,4	232,8 \pm 80,6	1,2 \pm 1,6	81,0 \pm 47,3
	1	105,0 \pm 46,0 *	23,1 \pm 4,0 *	0,1 \pm 0,2	1,7 \pm 2,6 *
	2	79,2 \pm 48,2 *	43,1 \pm 2,4 *	0,1 \pm 0,2	9,6 \pm 4,4 *
	3	206,3 \pm 73,4	68,1 \pm 22,4 *	2,3 \pm 3,2	8,0 \pm 3,5 *
	4	299,0 \pm 66,7	84,9 \pm 12,6 *	0,0 \pm 0,0	48,2 \pm 28,4
	Estatística	F = 12,381 p = 0,0003	F = 13,001 p = 0,0003	H = 8,9344 p = 0,0628	F = 5,238 p = 0,0112
Estuário do Rio Ipojuca	Cont 2	102,4 \pm 75,9	115,8 \pm 57,8	57,8 \pm 9,1	8,4 \pm 11,1
	5	19,4 \pm 13,2	5,0 \pm 2,7 *	21,9 \pm 7,7 *	69,9 \pm 12,6 *
	6	24,4 \pm 16,8	6,6 \pm 5,4 *	16,3 \pm 11,1 *	13,2 \pm 4,9
	7	36,4 \pm 14,5	7,1 \pm 2,0 *	37,6 \pm 11,4	3,2 \pm 4,7
	8	4,4 \pm 1,3 *	4,7 \pm 3,2 *	28,8 \pm 7,5 *	17,0 \pm 7,7
	9	17,3 \pm 8,4	5,0 \pm 6,9 *	16,0 \pm 6,4 *	55,8 \pm 33,7 *
Estatística	H = 12,9183 p = 0,0242	H = 9,7368 p = 0,0831	F = 12,759 p = 0,0001	F = 10,456 p = 0,0002	

Tab. 6.6 – Concentração média de metais, matéria orgânica (M.O.) e percentuais médios de cascalho, areia e silte+argila dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco e chuvoso no ano de 2005/2006.

Ponto de coleta	Período de coleta	Metais							M.O. (%)	Casc (%)	Areia (%)	S+A (%)
		Cr (µg/g)	Cu (µg/g)	Mn (µg/g)	V (µg/g)	Zn (µg/g)	Fe (%)	Al (%)				
1	chuvoso	35,4	11,8	27,1	75,6	26,5	1,2	0,9	10,9	2,6	78,1	19,3
	seco	28,5	9,8	30,8	75,0	38,4	1,1	1,3	9,0	2,0	74,3	23,7
2	chuvoso	18,3	7,5	37,0	47,9	46,0	0,9	1,4	4,2	0,4	86,7	12,9
	seco	36,7	15,3	53,0	90,3	48,9	1,7	1,5	5,3	0,3	86	13,7
3	chuvoso	14,2	2,2	24,5	43,3	20,3	0,7	0,4	7,8	0,5	83,8	15,7
	seco	21,7	12,3	37,9	46,7	39,1	1,3	1,5	9,2	0,9	76,1	23
4	chuvoso	21,2	4,8	15,4	47,8	15,3	0,8	0,1	9,1	0,2	90,3	9,5
	seco	22,7	10,6	29,2	52,7	38,5	1,0	1,1	5,8	1	90,3	8,7
5	chuvoso	6,6	9,2	31,7	18,0	18,0	0,7	0,5	7,0	2,7	84,7	12,6
	seco	23,2	9,9	65,1	50,7	49,4	1,0	1,0	1,7	1	95,7	3,3
6	chuvoso	10,6	3,3	48,6	23,5	22,0	0,6	0,4	4,9	0,9	84,3	14,8
	seco	22,0	9,2	63,0	57,6	41,6	1,0	1,3	2,4	0,4	89,5	10,1
7	chuvoso	19,1	15,1	34,6	41,1	30,3	1,2	1,3	14,5	0,9	80,4	18,7
	seco	44,4	18,0	93,1	79,6	57,1	2,3	2,5	24,3	1,3	78,9	19,8
8	chuvoso	44,4	26,9	168,0	112,3	81,6	3,5	3,7	10,0	0,9	78,3	20,8
	seco	36,9	13,8	61,6	60,7	81,8	1,6	0,7	9,7	3	90,2	6,8
9	chuvoso	21,6	12,0	46,3	44,7	38,6	1,6	2,0	6,5	0,8	89,6	9,6
	seco	26,3	13,6	49,0	56,7	50,6	2,0	2,4	1,0	0,5	95,7	3,9

Tab. 6.7 – Valores médios de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) encontrados nos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco (os) e chuvoso (pc) do ano de 2005/2006 e no estuário do rio Maracaípe.

	Pontos de coleta	Período de coleta	Pristano	Fitano	n-alc	HRP	MCNR	HTP	Índices		
									IPC	MCNR/HRP	%MCNR/HT
Controle (Maracaípe)			0,27	1,85	123,67	181,69	80,08	262,00	5,06	0,44	30,57
Porto Interno de Suape	1	pc	0,00	0,00	5,76	8,11	19,38	27,61	3,59	2,39	70,19
		ps	0,00	0,03	4,26	14,31	41,90	56,46	2,86	2,93	74,22
	2	pc	0,00	0,00	3,16	4,33	4,45	8,89	3,89	1,03	50,05
		ps	0,00	0,02	3,67	12,36	32,29	44,89	4,56	2,61	71,95
	3	pc	0,00	0,01	9,34	10,34	11,89	22,23	3,52	1,15	53,48
		ps	0,00	0,02	5,31	16,31	36,24	52,78	3,28	2,22	68,66
	4	pc	0,00	0,01	3,18	4,78	7,22	12,01	3,09	1,51	60,16
		ps	0,00	0,03	2,90	13,01	36,20	49,45	5,37	2,78	73,21
Estuário do Rio Ipojuca	5	pc	0,00	0,00	5,16	7,60	36,60	44,20	5,60	4,82	82,82
		ps	0,00	0,01	1,54	20,77	59,17	80,17	3,09	2,85	73,80
	6	pc	0,00	0,01	1,44	1,90	3,46	5,36	2,32	1,82	64,49
		ps	0,00	0,02	2,03	19,77	56,46	76,46	2,35	2,86	73,84
	7	pc	0,00	0,04	12,74	17,84	60,74	78,58	3,84	3,40	77,30
		ps	0,00	0,02	8,44	20,27	57,82	78,32	3,78	2,85	73,82
	8	pc	0,00	0,01	3,43	4,88	7,75	10,71	4,14	1,59	72,31
		ps	0,00	0,06	4,76	9,93	29,59	39,67	4,58	2,98	74,58
	9	pc	0,00	0,00	2,03	2,14	7,15	9,29	4,20	3,34	76,95
		ps	0,00	0,00	2,33	11,95	32,42	44,60	2,62	2,71	72,68

MCNR – Mistura Complexa Não Resolvida; HTP – Hidrocarbonetos totais de petróleo; IPC – índice preferencial de carbono; HRP – hidrocarbonetos resolvidos de petróleo.

Tab. 6.8 – Valores médios de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) (ng.g^{-1} peso seco) encontrados nos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca nos períodos seco e chuvoso do ano de 2005/2006 e no estuário do rio Maracaípe.

HPA	controle	Porto Interno de Suape								Estuário do Rio Ipojuca									
		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
		pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps	pc	ps
Naftaleno	< 0.1	nd	nd	1,5	nd	1,4	1,2	0,4	1,2	1,5	nd	-	0,5	24,5	1	-	22,7	14	0,35
Acenaftileno	0,2	0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,6	0,5	-	1	29,4	3,4	-	8,3	6,75	0,15
Acenafteno	< 0.1	nd	nd	0,1	nd	nd	0,2	0,1	0,1	nd	0,1	-	0,1	3,2	0,5	-	0,9	0,75	nd
Fenantreno	3,4	7,6	8,9	0,7	5	5,5	8	0,7	5	6,4	7,4	-	8	86,3	28,5	-	54,9	38,45	4,55
Antraceno	< 0.1	0,1	0,5	0,2	0,1	0,3	1	0,1	0,1	0,5	0,7	-	0,8	14,4	4,8	-	6,7	5,15	0,2
Fluoranteno	4,7	2,4	6,4	3,5	2	2,5	21	5,1	5,5	4,2	8	-	7,3	75,6	12,9	-	21,3	10,8	3,1
Pireno	3,6	3,2	9,8	0,4	3,1	5,3	25,8	5,6	5,5	7,1	10,5	-	9,3	41,3	30	-	57,8	66,9	4,2
Benzo(a)antraceno	1,9	1	4,7	1,2	1,5	2,5	17,7	2,7	1,1	1,9	2,3	-	2,3	25,1	5,2	-	6,4	43,55	1,45
Criseno	2,7	1,3	5,6	1,8	1,2	2,5	16,7	4,1	1,9	2,2	3,5	-	3,3	29,2	6,9	-	14,2	71,55	1,25
Benzo(b)fluoranteno	3,1	1,7	4,7	2,2	1,5	2,2	15,3	4,2	2	4,4	4,9	-	4,5	24,3	10,2	-	13,6	14,3	2,3
Benzo(k)fluoranteno	1,3	0,6	1,8	0,8	0,5	0,75	7,2	1,6	0,7	1,5	1,7	-	1,6	9	3,2	-	4,1	5,2	0,85
Benzo(e)pireno	1,4	0,8	1,9	1	0,7	0,9	6,8	1,7	0,9	1,8	2,2	-	2	12,3	5,2	-	6,6	6,55	0,95
Benzo(a)pireno	2,2	0,8	2,9	0,9	0,8	1,2	12,6	2,4	1,1	2,1	3,1	-	3	16,9	5,7	-	5,8	7,95	1,2
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2	2	5,1	2	2	2,2	9,5	3,3	1,7	6,7	4,3	-	4,2	10,7	8,8	-	10,6	9,7	3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,4	0,2	1,1	0,3	0,3	0,4	1,3	0,6	nd	0,4	0,1	-	0,2	0,9	0,7	-	0,9	0,65	0,4
Benzo(g,h,i)perileno	1,5	2,2	4,5	2,5	1,9	2,6	7,7	2,8	2	7,8	5	-	4,7	14,1	10,8	-	13,9	10,7	3,35
TOTAL 16 HPAs	27,2	23,5	56,6	27,8	19,55	29,45	145,2	40,3	24	47,6	51,7	-	50,6	416	135,3	-	248,3	311,15	26,1
TOTAL HPAs	44,9	72,7	116	87,4	71,7	95,75	228,5	97,6	89,5	66,3	77,4	-	77,7	701,6	231,3	-	420,1	554,9	51
fenantreno/antraceno	npc	76,0	17,8	3,5	50,0	18,3	8,0	7,0	50,0	12,8	10,6	-	10,0	6,0	5,9	-	8,2	7,5	22,8
fluoranteno/Pireno	0,1	0,2	0,1	1,5	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	-	0,1	0,3	0,1	-	0,1	0,1	0,1
BaPi/criseno	0,8	0,6	0,5	0,5	0,7	0,5	0,8	0,6	0,6	1,0	0,9	-	0,9	0,6	0,8	-	0,4	0,1	1,0

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

6.5 DISCUSSÃO

A granulometria do sedimento coletado no CIPS vem se modificando ao longo do tempo. Quando comparamos as porcentagens de silte+argila em 2003 (Capítulo II) e neste capítulo, vemos que o sedimento mais fino ($< 63\mu\text{m}$) está sendo substituído por um sedimento mais arenoso. Este fato pode estar relacionado com as constantes dragagens e terraplanagens que a área vem sofrendo para a instalação de grandes empreendimentos na área.

De acordo com as concentrações de metais pesados nos sedimentos coletados no presente estudo, pode-se observar que seus valores apresentam-se mais baixos dos que os valores de referência descritos por Long *et al.* (1995) e pelo NOAA, os quais, segundo os autores, concentrações acima podem causar efeito para os organismos (Tab. 6.6).

Segundo Silva Júnior (2008), as concentrações de metais do Porto Interno de Suape e do Estuário do Rio Ipojuca quando comparadas com outros portos de outras regiões são inferiores, podendo estar relacionado com o menor tempo de funcionamento do Porto de Suape em relação aos outros portos e também ao tipo de material transportado, que no caso de Suape consiste em principalmente cereal e combustível.

Quando os valores de metais pesados no Porto de Suape são comparados ao longo do tempo (Chagas 2003; Capítulo II) pode-se observar uma elevação nas concentrações de Cr, Cu, Mn e V entre os períodos de 2003 a 2006. Esta elevação pode estar relacionada com dois fatores principais. Primeiro, as constantes dragagens ocorridas no porto, podem estar disponibilizando metais para a coluna d'água, e posteriormente, esses metais podem estar voltando para o sedimento mais uma vez. Segundo, pelo próprio processo de amadurecimento do Complexo Industrial Portuário, como foi colocado por Silva Júnior (2008).

As concentrações de HPAs no presente estudo, estiveram abaixo dos valores de referência descritos por Long *et al.* (1995) e contidos no NOAA. Ao contrário do que ocorreu com os metais, os HPAs não apresentaram crescimento em suas concentrações no período de 2003 a 2006 (Chagas, 2003; Capítulo II).

A Tab. 6.9 foi adaptada de Readman *et al.* (2002) e traz alguns dos valores característicos de índices moleculares para HPAs de origens pirolíticas e petrogênicas. De acordo com estes índices, apenas o controle e o ponto 7 possuem origens pirolíticas, com relação aos índices calculados. Os demais pontos apresentam origens tanto pirolíticas quanto petrogênicas. Porém, o Porto Interno de Suape e o Estuário do Rio Ipojuca ainda apresentam concentrações baixas quando comparados com outros portos do Brasil e do Mundo.

Tab. 6.9 – Índices característicos para avaliar a origem, petrogênica ou pirolítica, dos HPAs (FEN = fenantreno; ANT = antraceno; FLT = fluoranteno; PIR = pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; CRI = criseno).

	FEN/ANT	FLT/PIR	B(a)A/CRI
Origem pirolítica	< 10	> 1	> 0,9
Origem petrogênica	> 15	< 1	≤ 0,4

Adaptado de Readman *et al.* (2002)

Análises de hidrocarbonetos totais no presente estudo demonstraram um alto valor no controle ($262 \mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto que os demais pontos apresentaram valores inferiores a $100 \mu\text{g.g}^{-1}$, que é um valor limite para áreas consideradas não contaminadas. Porém, quando analisamos alguns índices que ajudam a entender a origem desses hidrocarbonetos, tais como MCNR, relação entre MCNR e alifáticos resolvidos, a porcentagem da MCNR em relação aos hidrocarbonetos totais e o IPC, percebemos que essa grande carga de carbono no controle como nos outros pontos tem origem biogênica. Devido à predominância de, n-alcenos na faixa de n-C₂₅ a n-C₃₁, como também das cadeias ímpares sobre as cadeias pares, pode-se inferir que grande parte dos hidrocarbonetos totais nos pontos de coleta são originados de vegetais superiores.

Efeitos subletais variaram em relação aos pontos e aos períodos de coleta. Os sedimentos coletados no mês de julho/agosto causaram efeitos subletais em todos os pontos, evidenciando um agravamento da toxicidade neste período, onde há um aumento na quantidade de chuvas, confirmado pela baixa salinidade (principalmente no Ipojuca) e temperatura. Estas chuvas podem atuar como veículos, carreando uma grande quantidade de contaminantes para os rios e conseqüentemente até o ambiente costeiro.

Vários estudos realizados no Porto de Suape evidenciaram a contribuição dos rios para este local. Segundo Neumann-Leitão e Matsumura-Tundisi (1998), através de estudos no Porto de Suape, observaram que, de modo geral, maiores quantidades de nutrientes (NO₂, NO₃, PO₄ e SiO₄) ocorrem durante o período chuvoso e durante a baixa-mar. Estes nutrientes podem ter, em parte, sua origem nas diversas indústrias instaladas na Zona Industrial de Suape, com produção diversificada, incluindo indústrias químicas, têxteis, alimentares além da grande quantidade de carga orgânica doméstica que chega ao Rio Ipojuca, e conseqüentemente nos manguezais (Chagas, 2003; CPRH, 2003; Fernandes, 1999).

Um relatório realizado por Fernandes (1999), quando estudando a toxicidade do sedimento (através do elutriado) e da água do Porto de Suape utilizando como organismo-teste o camarão *Palaemon northropi*, não mostrou efeito letal agudo, e atribuiu este fato à baixa concentração de poluentes e/ou a reduzida biodisponibilidade.

De acordo com Araújo (2008) a toxicidade da água no Porto Interno de Suape, observada através de bioensaios realizados utilizando o desenvolvimento embrio-larval do *Lytechinus variegatus*, é mais crítica em agosto (final do período chuvoso) e outubro (início de seco), e que os locais mais afetados estão localizados mais próximos ao estuário do rio Massangana.

A FADE (2008), através do monitoramento toxicológico do sedimento do Porto Interno de Suape realizado pelo Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia desde abril de 2007 utilizando como organismo teste o copépodo *T. biminiensis*, tem observado que a área vem apresentando toxicidade subletal em todos os meses amostrados.

A sensibilidade a um contaminante depende da espécie e do parâmetro analisado. Geralmente, efeitos tóxicos sobre alimentação, desenvolvimento e reprodução são observados em concentrações inferiores em relação as que causam efeito letal, como pode ser observado em Lotufo (1997) e Lotufo (1998). Porém, Lotufo e Fleeger (1997) estudando o efeito do fenantreno em adultos e náuplios de *Nitocra lacustres*, observaram que os adultos são mais sensíveis do que os náuplios.

As concentrações de alguns hidrocarbonetos, metais e organoclorados capazes de causar efeito tóxico a espécies de copépodos podem ser vistas na Tab. 6.10. Comparando os resultados de metais e hidrocarbonetos do presente estudo e os capazes de causar efeito a espécies de copépodos da Tab. 6.10, vemos que as concentrações que ocorrem no Porto de Suape são menores. Esta baixa concentração pode ser um motivo para a não ocorrência de efeitos letais para esta área portuária. Porém, a existência de efeito subletal sugere que os contaminantes, mesmo em baixa concentração, possam estar sendo assimilados pelas fêmeas e então, transferidos para os ovos, causando um retardo no desenvolvimento dos mesmos pela sua contaminação interna.

Segundo Hogopian-Schlekat *et al.* (2001) a mistura de cinco metais causa um efeito significativamente maior sobre a sobrevivência de *Amphiascus tenuiremis* do que o simples efeito aditivo. O que nos leva a crer que, embora as concentrações de metais e hidrocarbonetos estejam bem abaixo da que causaria efeito (letal ou subletal) para copépodos, as interações dos diferentes contaminantes poderiam estar causando subletalidade ao *T. biminiensis*.

Tab. 6.10 – Sensibilidade de espécies de copépodos a diferentes poluentes.

Espécie utilizada	Composto	Parâmetro observado	Concentração	Fonte
<i>Schizopera knabeni</i>	Óleo diesel	CL ₅₀ -96h	194 µg.g ⁻¹	Lotufo (1997)
		Alimentação (CEO)	48 µg.g ⁻¹	
	Fenantreno	CL ₅₀ -96h	473 µg.g ⁻¹	
		Alimentação (CEO)	51 µg.g ⁻¹	
	Fluoranteno	CL ₅₀ -96h	2100 µg.g ⁻¹	
		Alimentação (CEO)	38 µg.g ⁻¹	
<i>Schizopera knabeni</i>	Fluoranteno	CL ₅₀ -96h	213 µg.g ⁻¹	Lotufo (1998)
		Reprodução (CEO)	47 µg.g ⁻¹	
<i>Coullana</i>	Fluoranteno	CL ₅₀ -96h	132 µg.g ⁻¹	
		Reprodução (CEO)	132 µg.g ⁻¹	
		Alimentação (CEO)	47 µg.g ⁻¹	
<i>Atheyyella crassa</i>	Tebuconazoli	Mortalidade de nauplios (CEO)	65 µg.L ⁻¹	Turesson <i>et al.</i> (2007)
		Produção de descendentes (CEO)	65 µg.L ⁻¹	
<i>Tisbe battagliai</i>	TBT-Cl	CL ₅₀ -48h	0,068 µmol.L ⁻¹	Macken <i>et al.</i> (2008)
	TPT-Cl	CL ₅₀ -48h	0,009 µmol.L ⁻¹	
	Benzo(a)Pireno	CL ₅₀ -48h	4,013 µmol.L ⁻¹	
	Fluoranteno	CL ₅₀ -48h	1,193 µmol.L ⁻¹	
	PCB 153	CL ₅₀ -48h	0,357 µmol.L ⁻¹	
<i>Amphiascus tenuiremis</i>	Cu	CL ₅₀ -96h	281,9 µg.g ⁻¹	Hagopian-Schlekat <i>et al.</i> (2001)
	Ni	CL ₅₀ -96h	355,6 µg.g ⁻¹	
	Pb	CL ₅₀ -96h	2462 µg.g ⁻¹	
	Zn	CL ₅₀ -96h	671,3 µg.g ⁻¹	

Não pode ser descartada a possibilidade da ocorrência de outros tipos de contaminantes que podem estar sendo carregados para esta área através das chuvas. No ano de 2005, segundo o INMET, os meses com maior intensidade de chuvas foram maio e junho. De acordo com Gunkel *et al.* (2006), não há na região costeira de Pernambuco nenhum rio sem influência do cultivo da cana de açúcar. E na área de coleta do presente estudo, observa-se a influencia de vários rios, Massangana e Tatuoca no Porto Interno de Suape, e Ipojuca e Merepe no estuário do rio Ipojuca, sendo o último de maior importância, pois drena

todo o Estado de Pernambuco, passando por cidades de grande importância como Caruaru, Garanhuns, Arcoverde e Ipojuca.

Segundo Gunkel *et al.* (2006) os impactos dominantes sobre a qualidade da água do Rio Ipojuca são despejos de esgoto doméstico, descarga de águas residuais da agricultura e de indústrias, além da monocultura da cana de açúcar e seu processamento. A fertigação (fertilização + irrigação), usada na cultura da cana de açúcar, representa um perigo para a qualidade de água superficial quando nutrientes e matéria orgânica alcançam as água por vias difusas ou acidentalmente através de vias diretas ocorridas com a estocagem e o transporte do vinhoto. Além disso, as plantações de cana de açúcar usam grandes quantidades de químicos tóxicos, tais como inseticidas e pesticidas. Desta forma, os efeitos subletais observados nos meses de julho e agosto no CIPS podem estar refletindo a entrada de contaminantes carregados pelos rios, que nutrem esta área, nos dois meses anteriores, e que, conseqüentemente, tenha sido depositado no sedimento e então disponível no período da coleta do sedimento.

A sensibilidade do copépodo *Tisbe battagliai* a cinco compostos (PCB 153, dois organoestânicos o TPT-Cl e o TBT-Cl, e dois hidrocarbonetos o benzo(a)pireno e o fluoranteno) foi avaliada por Macken *et al.* (2008), e foi observado que os compostos mais tóxicos foram os organo-estanhos, que são amplamente utilizados como biocidas. O TBT está presente em tintas antiincrustantes e foi motivo de preocupação nos estuários do Reino Unido e da França por provocarem redução na produção de ostras devido a contaminação destes animais por este composto (Felizzola, 2005).

Quando Macken *et al.* (2008) comparou a sensibilidade de copépodos (*T. battagliai*) com outros organismos (*Vibrio fischeri*, *Tetraselmis suecica*), a cinco contaminantes orgânicos, eles observaram que o copépodo foi o mais sensível, contrariando estudos que apontam a bactéria como sendo o teste mais sensível. Araújo (2008) estudando diferentes metodologias para testes de toxicidade de sedimento observou que o copépodo *T. biminiensis* apresentou resultados mais estáveis do que o desenvolvimento embriolarval do *Lytechinus variegatus* nos testes utilizando a interface sedimento/água e elutriado. O Capítulo IV também faz uma comparação de sensibilidade entre o copépodo *T. biminiensis* e a pós-larva do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, e novamente o copépodo se mostrou mais sensível.

O copépodo *T. biminiensis* utilizado no presente estudo mostrou-se como uma espécie sensível, de fácil cultivo, baixo custo para a realização de testes de toxicidade, e de fácil observação de efeitos letal e subletal. Desta forma, torna-se uma espécie com potencial para ser utilizado em testes de toxicidade para avaliação de impactos ambientais.

As baixas concentrações de metais pesados, HPAs e hidrocarbonetos alifáticos no Porto Interno de Suape e no estuário do rio Ipojuca, podem explicar a ausência de letalidade para *T. biminiensis* no presente estudo. Porém, a existência de efeitos subletais sugerem que

o grau de comprometimento do sedimento no CIPS é capaz de causar efeitos crônicos em longo prazo.

As concentrações de metais pesados no Porto Interno de Suape vêm apresentando elevações ao longo do tempo. Assim como os metais, a granulometria também tem apresentado modificações ao longo do tempo com a substituição de sedimento fino ($< 63 \mu\text{m}$) por areia. Comparando as duas áreas de estudo, verifica-se que com relação aos metais, aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os alifáticos, há uma concentração mais elevada no estuário do rio Ipojuca do que no porto interno de Suape, este fato pode estar relacionado com a maior contribuição de despejos industriais e urbanos no rio Ipojuca, uma vez que o mesmo passa por várias cidades do estado de Pernambuco. A toxicidade, que no ano de 2003 (Capítulo II), apresentou apenas um evento de toxicidade letal no estuário do rio Massangana durante o período seco, vem se agravando com o passar do tempo. No período de abril 2005 a janeiro de 2006, efeitos subletais foram observados em todos os pontos do Porto Interno de Suape e Estuário do Rio Ipojuca, e toxicidade subletal vêm sendo mais freqüente (Souza-Santos comunicação pessoal) no Porto Interno de Suape nos anos subsequentes. Desta forma, verifica-se que os sedimentos do Porto de Suape vêm se tornando mais tóxicos ao longo do tempo, e embora essa toxicidade seja apenas crônica, é um indicativo de que é uma área que necessita de um monitoramento constante que compreendam não só análises ecotoxicológicas como também análises químicas que consigam identificar uma ampla gama de contaminantes (sejam eles metais, hidrocarbonetos, agrotóxicos, etc.) e os responsáveis pelo seu lançamento. Uma vez identificado o(s) contaminante(s) bem como a sua fonte, é necessária uma intervenção para um plano e gerenciamento. Somente assim poderemos minimizar os efeitos tóxicos de seus sedimentos.

7. Capítulo IV

Avaliação da toxicidade de sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo (Bahia, Brasil) utilizando o copépodo *Tisbe biminiensis* e a PL do camarão *Litopenaeus vannamei*.

7.1 RESUMO

A toxicidade dos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo foi avaliada utilizando dois organismos-teste, o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* e a pós-larva (PL) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alifáticos foram investigadas para identificar possíveis relações entre a toxicidade e tais contaminantes. A Baía de Todos os Santos (BTS) apresenta intensa atividade petrolífera há mais de 50 anos, na bacia do Rio São Paulo existem diversos poços de petróleo, com registro histórico de incidentes. Para a avaliação da toxicidade, foram fixados 4 pontos, as coletas ocorreram nos meses de março e outubro de 2006, e em cada ponto foram coletadas três amostras. O sedimento controle foi coletado no estuário do Rio Maracaípe (Pernambuco, Brasil) longe de indústrias e centros urbanos. Em laboratório, o sedimento foi peneirado com uma malha de 63 μm de abertura, para que a fração fina fosse utilizada. Para o bioensaio usando o copépodo, os recipientes-teste receberam 2 g de sedimento e 20 mL de suspensão de diatomácea. Depois de 24 h, 10 fêmeas ovíferas foram adicionadas a cada recipiente e a cada dois dias 1 mL de suspensão de diatomácea foi adicionada. Para o bioensaio com a PL de camarão, foram utilizados recipientes de polietileno com capacidade para 700 mL. Cada recipiente recebeu 20 g de sedimento e 300 mL de água do mar e foram mantidos sob aeração. Após 24 h, 10 pós-larvas foram adicionadas em cada recipiente e alimentadas duas vezes ao dia com náuplios de *Artemia* sp. Os bioensaios tiveram duração de 7 e 10 dias para copépodos e PLs, respectivamente. No caso dos copépodos, ao final dos experimentos, o conteúdo dos recipientes foi corado e fixado para contagem das fêmeas vivas e dos descendentes. A determinação do efeito letal para as PLs foi através da observação de PLs sem movimento. Posteriormente, todas as PLs foram fixadas para determinação do tamanho e peso. Não foi observado efeito letal em nenhuma das espécies utilizadas. Porém, efeitos subletais foram observados quando o copépodo foi utilizado em três pontos em março (PB01, PB03 e PB4) e em apenas um no mês de outubro (PB03). Não foi observado qualquer efeito subletal quando utilizamos a PL do camarão. Identificaram-se correlações significativas entre efeitos subletais nos copépodos (fecundade, número de náuplios e número de copepoditos) e os HRP, HTP e MCNR.

7.2 INTRODUÇÃO

A Baía de Todos os Santos (BTS), localizada no Estado da Bahia (nordeste do Brasil), possui aproximadamente 927 Km² e 184 Km de extensão costeira, o que a torna uma das maiores baías do Brasil, é bordeada por uma extensiva quantidade de manguezais (Martins *et al.*, 2005), e apresenta-se como uma reentrância na costa, pela qual o mar penetra no interior do continente, a partir de um estreitamento principal entre a Cidade do Salvador e a Ilha de Itaparica. Este estreitamento possui cerca de 9 Km de largura e profundidade de até aproximadamente 50 m, em situação livre de assoreamento (CRA, 2001).

O processo de ocupação industrial na BTS iniciou-se na década de 50, quando foi implantada a Refinaria Landulpho Alves-Mataripe (RLAM), seguida da Fábrica de Asfalto (DTBASA), do Centro Industrial de Aratu (CIA) entre outras. Esses centros industriais concentram uma grande variedade de indústrias destinadas à produção de insumos petroquímicos, metalurgias, siderurgias, fabricação de papel, bebidas, produtos químicos em geral e outras atividades. A dinâmica de ocupação industrial propiciou o surgimento de Terminais Portuários dedicados ao escoamento de insumos gerados na indústria, tais como o Porto de Aratu e o Terminal Marítimo de Madre de Deus, além de pequenos terminais portuários particulares, como o terminal Dow Química na Baía de Aratu. Também foram implantadas atividades de exploração de jazidas petrolíferas, tanto no corpo hídrico (Campo de Dom João Mar), quanto em seu entorno (Campos Petrolíferos Terrestres em Candeias e Mataripe) (CRA, 2001).

A grande maioria dessas indústrias foi implantada antes do surgimento da Legislação ambiental, conseqüentemente, não houve um estudo básico nem mesmo um estudo de avaliação de risco. No intervalo de tempo transcorrido entre a implantação desses empreendimentos e o desenvolvimento da legislação de controle da contaminação, formou-se um passivo ambiental que afetou principalmente a região norte da BTS e a Enseada dos Tainheiros (CRA, 2001; Martins *et al.*, 2005).

Segundo a CRA (2001), não só os despejos industriais afetam a qualidade da água e do sedimento da BTS, podendo-se destacar também: i) despejos de esgotos domésticos das cidades do entorno e/ou na foz de seus rios contribuintes; ii) disposição de resíduos sólidos nas praias e/ou bacias contribuintes; e iii) atividades de dragagem, sejam para a manutenção da profundidade dos canais de acesso às instalações portuárias, construção de aterro ou para a extração de minério que foi realizada durante vários anos, mas hoje se encontra interrompida.

O primeiro diagnóstico ambiental desta área foi realizado na década de 90 e compreenderam aspectos sócio-econômicos, químicos, bênticos e ecotoxicológicos a fim de definir o possível impacto gerado pelas indústrias locais (da Silva *et al.*, 1997). Neste estudo, porém, não foi avaliada a toxicidade apresentada pelo sedimento.

Dentre as espécies de crustáceos utilizadas para avaliação de efeitos de poluentes sobre organismos, podemos citar os camarões penéideos. Esta família se encontra entre os crustáceos de maior sensibilidade e apresenta os pré-requisitos necessários à realização dos testes, tais como sensibilidade, ampla distribuição geográfica, importância ecológica e facilidade de manipulação em laboratório (Cripe, 1994; Chapman, 1998). A pós-larva (PL) após alcançar o estágio de PLVII, desenvolve um comportamento bêntico que é particularmente apropriado para testar a toxicidade de sedimentos (Evangelista *et al.*, 2005).

A espécie *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) é nativa do Oceano Pacífico, apresenta grande importância comercial, é muito explorada em aquicultura em todo o mundo devido ao seu rápido crescimento e é amplamente utilizada em cultivos no Brasil (Sevilla, 2004). Estes organismos foram utilizados por Evangelista *et al.* (2005) em testes ecotoxicológicos utilizando sedimento coletado em diferentes pontos da Baía de Todos os Santos.

O presente trabalho tem como objetivo descrever a toxicidade dos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo na BTS, utilizando testes letais e subletais com o copépodo *T. biminiensis* e a pós-larva de camarão *L. vannamei*, bem como comparar a sensibilidade entre as duas espécies utilizadas e correlacionar os efeitos toxicológicos com as concentrações de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos da área de estudo.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 Área de estudo

A Baía de Todos os Santos (12°39'40"S e 38°34'30"W) (Fig. 7.1) apresenta grande importância econômica e histórica a nível regional, sendo considerada uma das maiores e mais importantes baías navegáveis da costa tropical do Brasil. Ela apresenta ecossistemas característicos de regiões tropicais e subtropicais, como a mata Atlântica e as restingas. Nas áreas de influência das marés, encontram-se os manguezais, as praias e os recifes de corais (CRA, 2002).

O clima da região é classificado como quente e úmido, distinguindo-se duas estações: uma seca, de setembro a fevereiro, e outra chuvosa, de março a agosto. As chuvas são predominantes no inverno e a precipitação média anual é de 1900 mm, com maiores valores em abril e agosto. No interior da baía, os ventos são geralmente nordeste no verão e sudeste no inverno. A temperatura média anual é de 25 °C, com amplitude térmica de 5,5 °C, temperaturas máximas de 28 °C e mínimas de 22,8 °C (Veiga, 2003).

As marés no interior da baía são semi-diurnas. Considerando os ciclos de maré nos períodos de quadratura e de sizígia, observa-se que nos ciclos de sizígia, as amplitudes das marés chegam a ser duas vezes maiores que nos ciclos de quadratura, variando, no interior da baía, de menos de 2 m no período de quadratura, até cerca de 3 m no período de sizígia. A circulação das águas na BTS é predominante controlada pela maré. A velocidade das

correntes superficiais é da ordem de 130 cm/s, no canal de acesso à baía, sendo essas correntes principalmente orientadas no sentido norte-sul (CRA, 2002). Segundo Nascimento *et al* (2000), essa circulação permite, exceto em algumas áreas de bordas, altos níveis de reciclagem da água.

A textura dos sedimentos superficiais de fundo da BTS varia desde argila a areia muito grossa, com distribuição espacial diferenciada, apresentando sedimentos argilosos na porção norte da baía enquanto que ao sul verifica-se que as areias médias e grossas são mais expressivas (Lessa *et al.*, 2000).

Foi no estuário do Rio São Paulo, localizado na porção nordeste da Baía de Todos os Santos, onde foi verificada presença de extensa área de manguezal e de substrato com exudação de óleo, que foram determinados e georeferenciados 4 pontos de coleta.

O estuário do Rio São Paulo situa-se na área de influência dos Municípios de Candeias e São Francisco do Conde. Na sua bacia de drenagem se desenvolvem diversos tipos de atividades. A natureza destas atividades é predominantemente industrial, e vinculada às atividades de exploração, refino e armazenamento de petróleo. Na Bacia do Rio São Paulo existe diversos poços de petróleo, com registro histórico de incidentes do tipo “blow-out” (explosão de poços), levando à contaminação de manguezais com óleo cru (petróleo). Além da contribuição de contaminantes da cadeia petrolífera, o Rio São Paulo também recebe contribuições de esgotos domésticos principalmente da Cidade de Candeias e descargas industriais, destacando-se a da indústria Metacril, situada no baixo estuário. Apesar de toda a contribuição de contaminantes para este ambiente, ainda é possível verificar no seu estuário a pratica de atividades de pesca artesanal e mariscagem, da qual provém o sustento de populações ribeirinhas (CRA, 2001).

De acordo com os resultados obtidos no relatório de técnico realizado pelo Centro de Recursos Ambientais da Bahia (CRA, 2001), os dados de qualidade das águas do Estuário do Rio São Paulo em abril de 2001 indicaram uma condição de adequação em relação à Classe 7 da Resolução CONAMA 20/86 para a maioria dos parâmetros avaliados. Os únicos desvios detectados na amostragem se referem ao oxigênio dissolvido. Em agosto não foram detectadas violações da Resolução CONAMA 20/86 (CRA, 2001).

Em relação aos sedimentos foram detectados desvios para os metais cobre e zinco. A região apresenta diversas fontes potenciais de poluição por metais pesados, que são as indústrias situadas ao longo do curso do rio e a RLAM na região de Mataripe. Em agosto as concentrações de cobre e zinco também estiveram acima do valor de referência adotado, o mesmo acontecendo com o chumbo no ponto SL5300 (CRA, 2001).

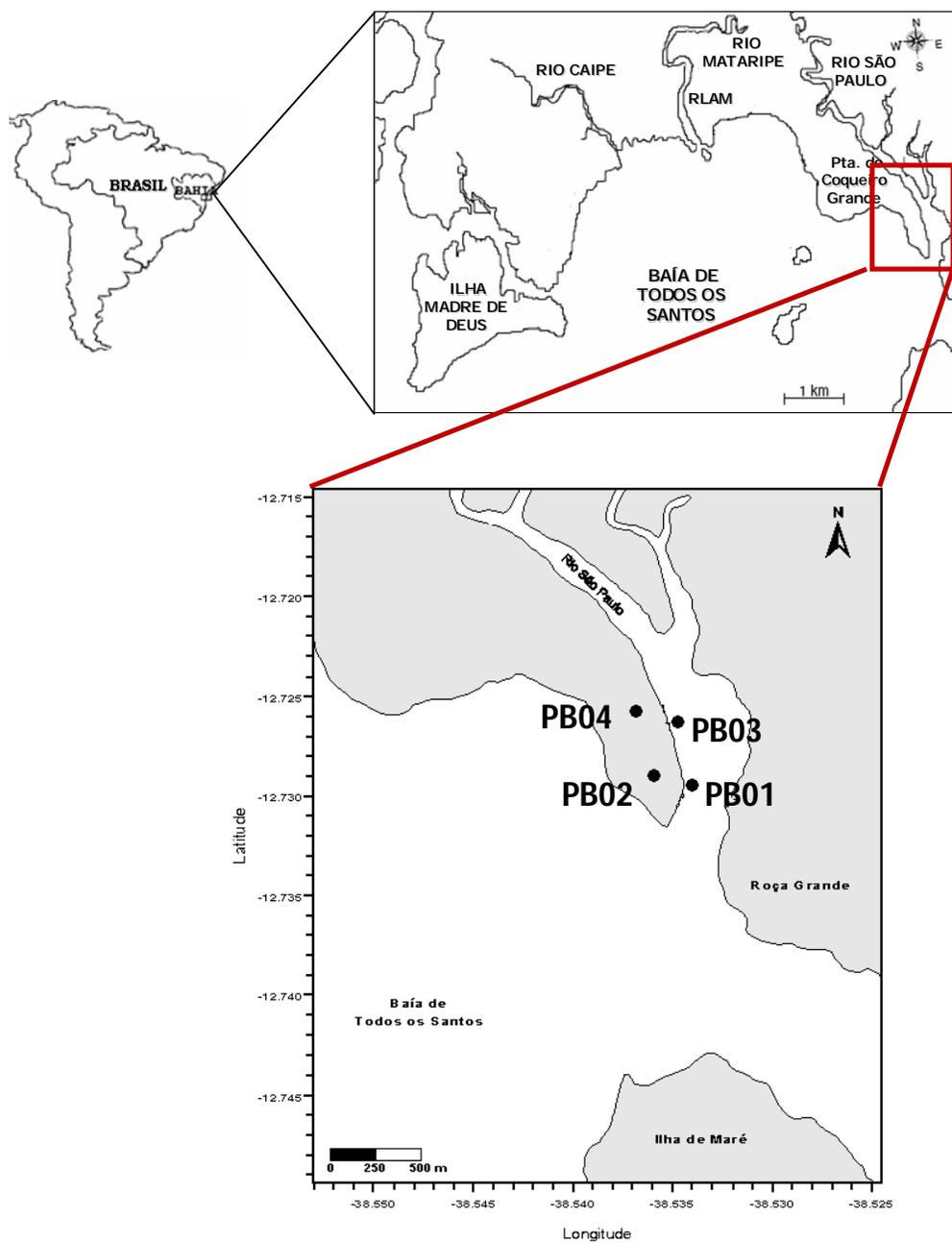


Fig. 7.1 – Mapa com a localização dos pontos dos quatro pontos de coleta no estuário do Rio São Paulo, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

7.3.2 Coleta das amostras de sedimento

As coletas de sedimento foram realizadas nos meses de março e outubro de 2006 em baixa-mar nas marés de sizígia, em 4 pontos de coleta no mediolitoral (PB01, PB02, PB03 e PB04) (Fig. 7.2). Para a determinação dos pontos de coleta foi utilizado um GPS. Em cada ponto foram coletadas 3 réplicas de sedimento, com ajuda de uma espátula, previamente descontaminada e lavada com água local, retirando os 5 primeiros centímetros. As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro descontaminados e colocadas em isopor contendo gelo. Medições de OD, pH e salinidade foram obtidas de poças formadas durante a baixa-mar em cada ponto, a fim de caracterizar inicialmente o ambiente (Tab. 7.1).

Em laboratório, o sedimento coletado foi peneirado utilizando uma malha de 63 µm para remoção de possíveis predadores, sendo utilizada, quando necessária, uma pequena quantidade de água do local de coleta. Após o peneiramento, a fração fina era devolvida para seus recipientes de vidro previamente lavados com água destilada, e levada à geladeira a 4 °C por cerca de 16h para a remoção do sobrenadante.

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) do Depto. De Oceanografia da UFPE. Para isto, as amostras foram acondicionadas em isopor contendo gelo e foram transportadas para Recife de avião.

Tab. 7.1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta e valores de pH, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade obtidos no estuário do Rio São Paulo (BTS) nos meses de março e outubro de 2006.

Mês de Coleta	Ponto de Coleta	UTM (N)	UTM (E)	pH	O.D.	Salinidade	Temperatura
Março	PB01	594.326	549.355	7,3	8,1	27	28,0
	PB02	594.045	549.348	6,7	8,3	41	30,9
	PB03	594.305	548.997	6,7	8,3	40	33,1
	PB04	594.441	548.751	6,8	8,3	42	31,5
Outubro	PB01	549.206	549.551	7,1	6,9	31	28,5
	PB02	549.019	549.462	7,2	6,9	31	28,5
	PB03	549.196	549.119	7,2	6,7	32	29,3
	PB04	549.347	548.881	7,7	4,4	34	29,6

7.3.3 Bioensaio com *T. biminiensis*

O procedimento para realização dos testes de toxicidade com sedimento do estuário do Rio São Paulo utilizando o copépodo *T. biminiensis* seguiu a mesma metodologia descrita no Capítulo I e II. Os endpoints analisados foram os mesmos do Capítulo III. Testes de referência

com dicromato de potássio foram realizados paralelamente aos testes com sedimento para testar a sensibilidade do grupo utilizado.

7.3.4 Bioensaio com o camarão *Litopenaeus vannamei*

Os bioensaios com as PLs do camarão *L. vannamei* foram adaptados da metodologia de Nascimento e Evangelista (2002). As PLs foram cedidas pela empresa Aqualider, localizada em Ipojuca (PE).

Para cada réplica de sedimento coletada foi utilizado um único grupo de 10 indivíduos, totalizando 3 grupos por ponto de coleta, para o sedimento controle foram utilizados 5 grupos. Os testes foram realizados em recipientes de polietileno com capacidade para 750 mL, os quais receberam 20 g de sedimento e 300 mL de água do mar filtrada a 31‰ cada (na mesma salinidade que as PLs estavam sendo cultivadas na larvicultura de origem), sendo mantidos no laboratório com temperatura controlada (27 ± 1 °C) por um período de 24 horas sob aeração fraca para evitar a ressuspensão do sedimento. Após este período, 10 pós-larvas de 7 a 8 dias (PL VII e VIII) foram adicionadas em cada recipiente. A duração deste experimento foi de 10 dias e as PLs recebiam alimento duas vezes ao dia, sendo sua dieta composta de náuplios de *Artemia* sp.

Os cistos de *Artemia* sp. foram cedidos pela empresa Aqualider os quais permaneceram armazenados em geladeira até a eclosão. Para sua eclosão, os cistos foram hidratados em água destilada por 1 h. Em seguida, a água doce foi retirada, sendo substituída por 600 mL água do mar na salinidade de 35 em um becker de vidro com capacidade para 1000 mL. O becker foi incubado em fotoperíodo de 13h luz/11h escuro, com aeração constante e temperatura de 28 °C ± 1 por 24 h. Após este período de incubação, os náuplios de *Artemia* sp. foram separados utilizando atração luminosa. Esta técnica consiste em colocar uma fonte luminosa na parte inferior do becker de modo que os náuplios fossem atraídos para o fundo e os ciscos ficassem na superfície, e com a ajuda de uma mangueira de aeração, os náuplios foram sifonados para um outro recipiente. Depois desse procedimento, os náuplios de *Artemia* foram ofertados às larvas de *L. vannamei*.

Simultaneamente à montagem do teste, foram separados três grupos de 10 pós-larvas para determinação do tamanho e do peso seco inicial. Após a medição sob lupa e placa de Petri milimetrada, as pós-larvas foram colocadas em papéis alumínio pré-secos e pré-pesados e levadas à estufa a uma temperatura de 60 °C por um período de 24h. Após este período, os papéis alumínio com as 10 pós-larvas foram colocados em dessecador por 2 horas e pesados em balança de precisão. Medidas de temperatura, pH, OD, salinidade, amônia e nitrito na água foram realizadas nos períodos de 1, 5 e 10 dias após a adição das pós-larvas. Seguindo a metodologia em que foram baseados os experimentos, a temperatura

da água foi mantida a 28 ± 2 °C, o pH entre 7 e 9, oxigênio sob saturação durante todo o teste, salinidade a 30 ± 5 , amônia e nitrito a 0,1 e 1,0 mg de N/litro respectivamente.

Ao final do período do teste, o sedimento foi retirado com ajuda de uma malha de 200 μm e foram observadas e quantificadas as pós-larvas mortas. Os indivíduos ausentes ou sem movimentos foram tidos como mortos e os demais foram fixados com formol a 4%, para a realização das medições e pesagem, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Os efeitos observados foram mortalidade (efeito letal), crescimento e ganho de peso (efeitos sub-letais) dos indivíduos. Para obter o crescimento, o tamanho final de cada pós-larva foi subtraído pela média do tamanho inicial. Do mesmo modo, o ganho de peso foi obtido subtraindo o peso de cada grupo de pós-larva pelo peso médio inicial.

7.3.5 Determinação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

As amostras foram encaminhadas para laboratório para determinação das frações de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos através dos métodos USEPA8270D e USEPA8015B. As análises foram efetuadas utilizando padrões internos e o programa analítico conduzido sob condições controladas de laboratório como descritas a seguir:

Cromatografia Líquida

Uma massa de 10 g da amostra de sedimento, sem tratamento prévio, foi extraída com diclorometano ultra-puro em soxhlet. O extrato orgânico foi então concentrado em um concentrador de célula fechada do tipo Kuderna Danish a um volume de 1 mL. A massa de óleo foi determinada neste concentrado por gravimetria.

A fração de hidrocarbonetos saturados foi separada deste extrato através do tratamento do mesmo com uma coluna de sílica gel ativada e eluição com hexano ultra-puro. A fração de hidrocarbonetos aromáticos foi separada através da eluição com uma mistura de hexano/diclorometano da mesma coluna, e a fração de NOS foi separada através da eluição do mesmo extrato na coluna com metanol. Todas as frações foram determinadas por gravimetria.

Cromatografia gasosa de hidrocarbonetos saturados

Uma massa de 10 g da amostra de sedimento, sem tratamento prévio, foi fortalecida com uma solução de hidrocarbonetos poliaromáticos a concentrações definidas e extraída com hexano ultra-puro em soxhlet. O extrato orgânico foi então concentrado em um concentrador de célula fechada do tipo Kuderna Danish a um volume de 1 mL. A massa de óleo foi determinada neste concentrado por gravimetria e a fração de hidrocarbonetos saturados foi separada deste extrato através do tratamento com uma coluna de sílica-gel

ativada. O concentrado final foi diretamente injetado, sem divisão de fluxo, em uma coluna de fase estacionária 30 m DB-5 instalada em um cromatógrafo a gás HP 6890.

A programação da cromatografia gasosa (CG) é a seguinte: injeção sem divisão de fluxo, com o injetor a 280 °C; temperatura inicial da coluna 50 °C, isoterma por 1 minuto, taxa de aquecimento de 6 °C/min até a temperatura final de 310 °C, isoterma de 10 minutos.

7.3.6 Análises estatísticas

Para a identificação de diferenças significativas entre os pontos de amostragem foi utilizada a ANOVA, após a verificação da normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, sendo o nível de significância igual a 0,05. Quando se detectou diferenças, o teste de Tukey foi usado para comparar as médias, aos pares.

Análises de correlação de Pearson foram realizadas para identificar correlações entre os dados biológicos e os dados químicos da região.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Parâmetros hidrológicos

Os resultados de OD, pH, salinidade e temperatura obtidos em campo podem ser vistos na Tab. 7.1. Os valores de OD, salinidade e temperatura foram maiores no mês de março em relação ao mês de outubro. Os valores de pH foram os mais uniformes, variando entre 6,7 e 7,7.

Os parâmetros físico-químicos medidos em campo refletem a condição ambiental no momento da coleta. Contudo, os parâmetros físico-químicos nos recipiente-experimentais no laboratório são monitorados, e caso haja uma variação significativa entre os valores iniciais e finais, o teste é descartado e realizado outro.

7.4.2 Bioensaio com o copépodo *Tisbe biminiensis*

A média de sobrevivência de *T. biminiensis* no mês de março variou de 33% no ponto PB3 a 90% no controle, porém, estas variações não foram significativas (ANOVA, $F = 1,750$; $p = 0,2092$). No mês de outubro, observou-se um aumento na sobrevivência dos pontos PB2, PB3 e PB4 em relação a coleta no mês de março, e todos os pontos e controle apresentaram sobrevivência maior que 70%. A análise estatística não encontrou diferenças significativas (ANOVA, $F = 2,429$; $p = 0,1049$) entre os pontos de coleta no mês de outubro. Desta forma, observa-se que não houve efeito letal significativo para nenhum dos períodos de coleta em nenhum ponto amostrado (Fig. 7.3a).

Quanto à fecundidade, a coleta realizada no mês de março (Fig. 7.3b) apresentou diferenças significativas entre os pontos amostrados (ANOVA, $F = 4,319$; $p=0,0242$), sendo o ponto PB3 significativamente diferente do controle (Tukey: $p<0,05$), apresentando médias de

87 e 405 indivíduos, respectivamente, produzidos por 10 fêmeas ao final de 7 dias. No mês de outubro, também foram observadas diferenças significativas (ANOVA, $F=8,207$; $p=0,0020$), sendo o ponto PB03 significativamente inferior ao controle (Tukey: $p<0,05$), apresentando aproximadamente 186 e 325 indivíduos, respectivamente, por grupo de fêmeas no final do experimento (Fig. 7.3b).

Com relação ao número de náuplios, no mês de março observou-se uma diferença significativa entre os pontos de coleta (ANOVA, $F=6,936$; $p=0,0049$). Os pontos PB1 (95 ind/10 fem/7 dias), PB3 (27 ind/10 fem/7 dias) e PB4 (61 ind/10 fem/7 dias) apresentaram médias significativamente inferiores (Tukey: $p<0,05$) ao controle (316 ind/10 fem/7 dias) (Fig. 7.3c). No mês de outubro, os números de náuplios variaram significativamente entre as estações e o controle (ANOVA, $F=9,175$; $p=0,0012$). O ponto PB2 (com cerca de 265 náuplios) exibiu média significativamente superior ao controle (com cerca de 167 náuplios) (Tukey: $p<0,05$), não indicando portanto, efeito sub-letal (Fig. 7.3c).

O número de copepoditos no mês de março não apresentou variação significativa (ANOVA, $F=0,818$; $p=0,0640$) entre os pontos de coleta e o controle. O número de copepoditos em março variou de 18 ind/10 fêmeas/7 dias, no ponto PB01, e 89 ind/10 fêmeas/7 dias, no ponto PB02 (Fig. 7.3d). Também não foram observadas diferenças significativas (ANOVA, $F=2,682$; $p=0,0830$) para o número de copepoditos entre os pontos de coleta e o controle durante o mês de outubro, com médias entre 176 ind/10 fêmeas/7 dias, no ponto PB2, e 96 ind/10 fêmeas/7 dias, no ponto PB03 (Fig. 7.3d).

7.4.3 Bioensaio com o camarão *Litopenaeus vannamei*

Nos bioensaios realizados com PLs, não foi observado efeito letal em nenhum dos meses amostrados (ANOVA, $F = 0,295$; $p = 0,8758$ para março e $F=2,015$; $p=0,1562$ para outubro), com valores médios de sobrevivência variando entre 87% e 93% para os pontos PB02 e PB01 respectivamente no mês de março e entre 93% e 100% para os pontos PB01 e PB03 respectivamente para o mês de outubro (Fig. 7.4a).

Com relação aos efeitos subletais, não foram observadas diferenças significativas no crescimento das pós-larvas referentes ao mês de março (ANOVA, $F= 1,460$; $p = 0,2744$). Porém, foram observadas diferenças significativas em relação ao crescimento no mês de outubro (ANOVA, $F= 7,494$; $p = 0,0029$), e segundo o teste de Tukey, os pontos PB01 e PB03 apresentaram crescimento superior em relação ao controle (Fig. 7.4b e Tab. 7.2). Com relação ao ganho de peso, não foram observadas diferenças significativas no mês de março (ANOVA, $F =1,631$; $p = 0,2302$) ou no mês de outubro (ANOVA, $F=3,270$; $p=0,05$) (Fig. 7.4c e Tab. 7.2).

7.4.4 Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

As concentrações de hidrocarbonetos alifáticos totais variaram de 14,9 a 393,89 $\mu\text{g/g}$ (peso seco). As maiores concentrações foram observadas nas estações PB1 e PB3 em ambos os meses de coleta, e na estação PB4 no mês de março. Os valores de n-alcenos variaram de n.d. a 6,33 com uma predominância das cadeias ímpares sobre as pares. A mistura complexa não resolvida (MCNR) e os hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) variaram de 7,44 a 125,88 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e de 7,46 a 325,32 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Os pontos com maiores concentrações de MCNR e HRP foram PB1 e PB3 em ambos os meses e o ponto PB4 em março (Tab. 7.3).

As concentrações de HPA Totais nos sedimentos superficiais coletados no estuário do Rio São Paulo variaram de 34,5 a 245,3 ng.g^{-1} (peso seco). Os valores máximos foram encontrados nos pontos PB1, em ambos os meses, e PB4 no mês de março (Tab. 7.4). As estações do Estuário do Rio São Paulo mostraram razão fluoranteno/pireno (flth/Pyr) ≤ 1 , e a razão fenantreno/antraceno (Phe/Ant) < 15 sugerindo fontes petrogênicas e pirolíticas de HPA (Tab. 7.4).

Tab. 7.2 – Médias (\pm desvio padrão) do ganho de peso (mg de peso seco) e crescimento (mm) do camarão *Litopenaeus vannamei* quando exposto aos sedimentos do estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE) em março e outubro de 2006.

Efeito	Ponto de Coleta	Mês de Coleta	
		Março	Outubro
Ganho de Peso (mg)	Controle	0,38 \pm 0,20	0,13 \pm 0,13
	PB01	0,41 \pm 0,04	0,32 \pm 0,13
	PB02	0,62 \pm 0,15	0,36 \pm 0,14
	PB03	0,39 \pm 0,20	0,32 \pm 0,16
	PB04	0,56 \pm 0,06	0,07 \pm 0,08
Crescimento (mm)	Controle	3,2 \pm 0,6	2,42 \pm 0,30
	PB01	3,2 \pm 0,4	3,12 \pm 0,35
	PB02	3,5 \pm 0,1	2,99 \pm 0,14
	PB03	3,6 \pm 0,2	3,45 \pm 0,34
	PB04	3,8 \pm 0,1	2,64 \pm 0,23

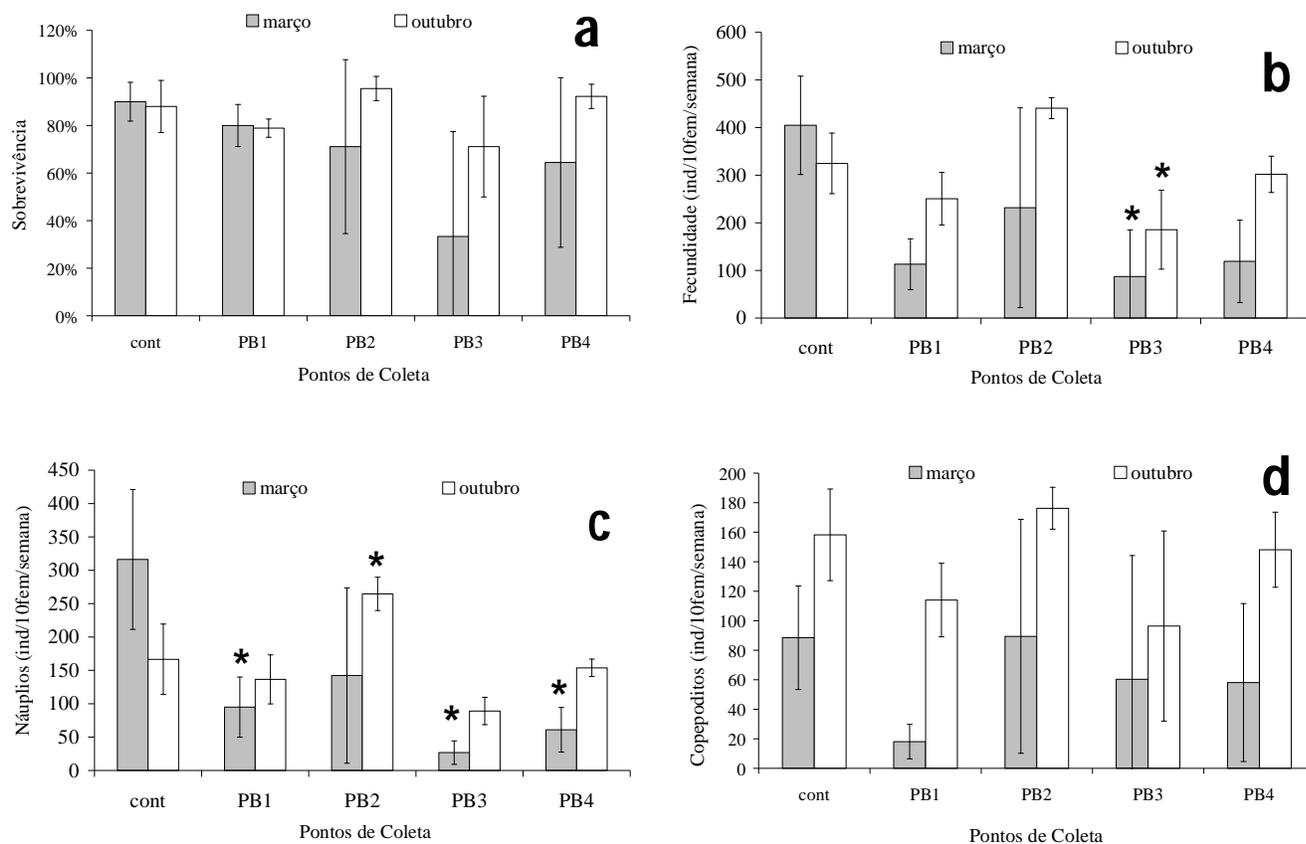


Fig. 7.2 – Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e número de copepoditos (d) de *Tisbe biminiensis* expostos aos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE) nos meses de março e outubro de 2006. * representa diferença significativa em relação ao controle, de acordo com o teste de Tukey.

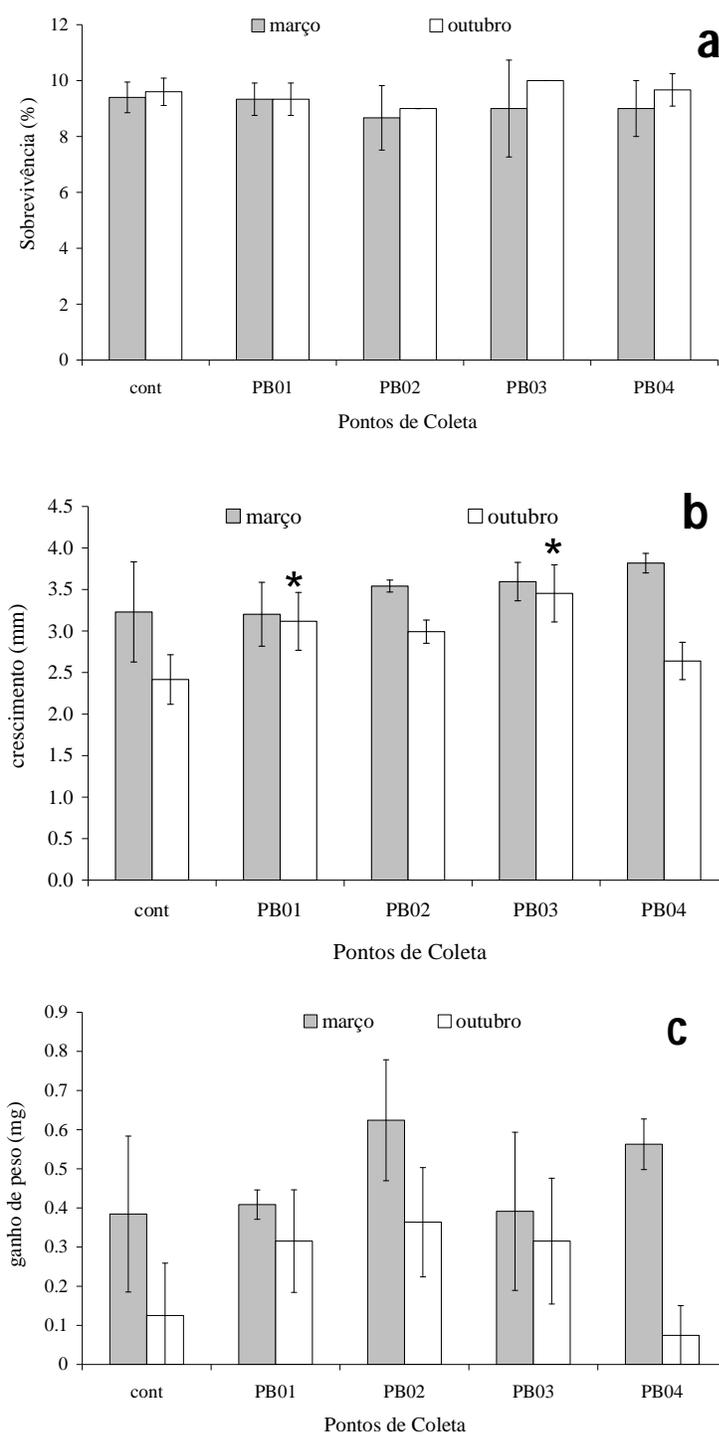


Fig. 7.3 – Médias (\pm desvio padrão) de sobrevivência (a), crescimento (b) e ganho de peso (c) das pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* expostas aos sedimentos coletados no estuário do Rio São Paulo (BTS) e controle (Maracaípe-PE), coletados em março e outubro de 2006. * representa diferença significativa em relação ao controle, de acordo com o teste de Tukey.

7.4.5 Análise de correlação

Análises de correlação de Pearson foram realizadas para tentar definir padrões de correlações entre as respostas biológicas e os resultados de hidrocarbonetos obtidos com os sedimentos do Estuário do Rio São Paulo.

Foram identificadas correlações positivas significativas entre os parâmetros sub-letais (fecundidade, número de náuplios e número de copepoditos) de *T. biminiensis* e o Benzo(k)Fluoranteno (Tab. 7.5). Com relação as PLs de *L. vannamei*, correlações positivas significativas foram observadas entre sobrevivência e acenafteno, e entre crescimento e crisenos. Também foi verificada uma correlação positiva significativa entre o crescimento da PL de *L. vannamei* e os HRP.

Os hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) apresentam correlação negativa significativa com a fecundidade, o número de náuplios e o número de copepoditos de *T. biminiensis*. Os HTP também apresentaram uma correlação negativa significativa com fecundidade e o número de náuplios de *T. biminiensis*. E por último, uma correlação negativa significativa foi observada entre MCNR e o número de náuplios de *T. biminiensis* (Tab. 7.5).

Tab. 7.3

Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em amostras de sedimento total do estuário do Rio São Paulo durante os meses de abril e outubro de 2006.

Hidrocarbonetos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pontos de coleta no Estuário do Rio São Paulo							
	PB1		PB2		PB3		PB4	
	abril	outubro	abril	Outubro	abril	outubro	abril	outubro
n-Alc.	1.34	nd	1.89	1.1	1.84	nd	6.33	2.16
n C25	nd	nd	nd	0.09	nd	nd	2.31	0.07
n C26	nd	nd	nd	0.11	nd	nd	nd	0.03
n C27	0.45	nd	0.35	0.18	0.95	nd	1.78	0.49
n C28	nd	nd	nd	0.03	nd	nd	nd	0.02
n C29	0.37	nd	1.12	0.3	0.37	nd	1.93	0.13
n C30	nd	nd	nd	0.04	nd	nd	nd	0.02
n C31	0.4	nd	0.31	0.05	0.53	nd	0.32	0.03
n C32	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
n C33	0.12	nd	0.1	Nd	nd	nd	nd	nd
Pri	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
Phy	nd	nd	nd	0.03	nd	nd	nd	0.02
HRP	64.77	47.06	18.89	7.44	95.93	33.05	125.88	9.18
MCNR	199.71	314.91	21.93	7.46	276.8	325.32	268.01	16.15
MCNR/HRP	3.083	6.692	1.161	1.003	2.885	9.843	2.129	1.759
HTP	264.48	361.97	40.83	14.9	372.73	358.37	393.89	25.33

n-Alc = total de alcanos normais, Pri = pristano, Phy = fitano, HRP = hidrocarbonetos resolvidos de petróleo, MCNR = mistura complexa não resolvida, HTP = hidrocarbonetos totais de petróleo.

Tab. 7.4

Concentrações de HPA (ng g⁻¹ de peso seco) em amostras de sedimento total do estuário do Rio São Paulo durante os meses de abril e outubro de 2006.

HPAs (ng g ⁻¹)	Pontos de coleta no Estuário do Rio São Paulo							
	PB1		PB2		PB3		PB4	
	abril	outubro	abril	Outubro	abril	outubro	abril	outubro
Naftaleno	6.6	13.3	5.2	20.9	5.5	2.7	20.4	9.8
Acenaftileno	30.6	22.4	n.d.	n.d.	4.8	3	n.d.	n.d.
Acenafteno	n.d.	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	2.1	n.d.	1.2
Fluoreno	8	4.7	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	1.3
Fenantreno	6.7	13.9	n.d.	2.8	n.d.	3.9	9.4	4
Antraceno	18.2	1	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	4.2	n.d.
Fluoranteno	28	14.4	12.1	6.8	n.d.	n.d.	52.5	3.2
Pireno	38.8	23.6	11.3	6.9	n.d.	5.1	58.6	4.2
BaA	24.2	11.6	2.5	3.8	n.d.	1.2	28.1	1.8
Criseno	16.4	12.5	4.6	6.9	24.2	30.5	50.2	4.4
BbF	n.d.	38.5	n.d.	15.2	n.d.	n.d.	n.d.	5.2
BkF	n.d.	4.3	n.d.	14.6	n.d.	n.d.	n.d.	5
BaP	36.4	17.8	5.1	5.6	n.d.	0.8	21.9	1.6
I[1,2,3-cd]Py	n.d.	11.9	n.d.	4	n.d.	n.d.	n.d.	1.5
DBA	n.d.	3.8	n.d.	1.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B[ghi]perileno	27.4	26.1	n.d.	9	n.d.	n.d.	n.d.	1.1
T HPA	241.3	220.7	40.8	98.1	34.5	51.6	245.3	44.3

Tab. 7.5

Resultado da análise de Correlação de Pearson (r , R^2 e p) entre os bioensaios com o copépodo *Tisbe biminiensis* e a PL de *Litopenaeus vannamei* e os principais compostos dos HPA e alifáticos.

		Copépodo <i>Tisbe biminiensis</i>				PL <i>Litopenaeus vannamei</i>		
		Sobreviv	Fecund	Naup	Copepod	Sobreviv	gpeso	Cresc
Acenaft	r(Pearson)	0,2107	0,1055	-0,0352	0,2924	0,9117*	-0,6625	-0,2533
	R2	0,0444	0,0111	0,0012	0,0855	0,8312	0,4389	0,0642
	p	0,6165	0,8036	-0,934	0,4822	0,0016	0,0734	0,545
Criseno	r(Pearson)	-0,5076	-0,6303	-0,6611	-0,5158	0,0734	0,397	0,7465*
	R2	0,2577	0,3972	0,4371	0,266	0,0054	0,1576	0,5572
	p	0,199	0,0938	0,0742	0,1907	0,8629	0,3301	0,0333
B(k)F	r(Pearson)	0,6415	0,9098*	0,893*	0,8318*	-0,0776	-0,2759	-0,6056
	R2	0,4115	0,8278	0,7975	0,6919	0,006	0,0761	0,3668
	p	0,0863	0,0017	0,0028	0,0104	0,8552	0,5084	0,1115
HRP	r(Pearson)	-0,7002	-0,793*	-0,7798*	-0,7223*	-0,2606	0,4717	0,7121*
	R2	0,4902	0,6289	0,6081	0,5217	0,0679	0,2225	0,5071
	p	0,0531	0,0188	0,0224	0,043	0,533	0,2379	0,0475
MCNR	r(Pearson)	-0,5609	-0,6747	-0,7163*	-0,5402	0,3038	0,0432	0,5455
	R2	0,3146	0,4553	0,5131	0,2918	0,0923	0,0019	0,2976
	p	0,148	0,0663	0,0456	0,1669	0,4644	0,9191	0,1619
HTP	r(Pearson)	-0,6341	-0,7504*	-0,7812*	-0,6226	0,1838	0,1531	0,6245
	R2	0,402	0,5632	0,6102	0,3877	0,0338	0,0234	0,39
	p	0,0913	0,0319	0,022	0,0991	0,6631	0,7173	0,0978

7.5 DISCUSSÃO

As baixas concentrações de HPAs no Estuário do Rio São Paulo, podem explicar a ausência de letalidade para *T. biminiensis* e para *L. vannamei* no presente estudo. Estudos na Baía de Todos os Santos, tais como Celino e Queiroz (2006) e Evangelista *et al.* (2005), têm demonstrado valores abaixo dos índices internacionais como o National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) e Long *et al.* (1995), e sugerem que tais hidrocarbonetos decorrem, além da indústria petrolífera, de outras fontes antropogênicas como recreação marinha (incluindo barcos, lanchas e *jet skis*), em especial em áreas com forte atrativo turístico (nos entornos das ilhas e praias urbanas da região). Além das fontes petrogênicas, há ainda hidrocarbonetos de origem biogênica, que podem ser originados do continente ou produzidos no próprio ambiente marinho (Zanardi *et al.*, 1999).

Em muitos estudos de contaminação, as comunidades bentônicas se mostram afetadas ao longo de gradientes de contaminação bem estabelecidos, no entanto, estes tipos de estudos são muito caros e consomem muito tempo, não sendo ideais para o uso em programas de rotina (Nascimento *et al.*, 1998). Espera-se então que testes usando amostras de substrato com uma espécie sensível, que apresente uma resposta consistente, sejam capazes de fornecer informações mais úteis (ASTM, 1997).

Como não foi observado efeito tóxico letal para *T. biminiensis* ou *L. vannamei*, sugere-se que os contaminantes estejam abaixo do nível capaz de provocar este efeito nestes organismos. Contudo, no ponto PB03, a sobrevivência do copépodo apresentou grande variabilidade, com valores de 83, 17 e 0%, sugerindo um efeito tóxico letal bem pontual, que pode ter tido relação com a presença de manchas de óleo irregulares distribuídas ao longo da área de estudo, que pode ter causado maiores efeitos nos organismos expostos aos sedimentos coletados exatamente nestas manchas de óleo. Este resultado mostra a importância da realização de no mínimo 3 amostragens em cada ponto de coleta.

Apenas o copépodo apresentou efeitos tóxicos sub-letais nos pontos PB01, PB03 e PB04 na coleta de março, e apenas para o ponto PB03 em outubro. É possível inferir menor grau de contaminação e maior disponibilidade de alimento no ponto PB02 do estuário do Rio São Paulo em relação aos outros pontos nesta área, baseado no incremento de alguns parâmetros analisados para o copépodo.

As análises de correlação de Pearson indicaram que os efeitos subletais observados com o copépodo podem estar relacionados com os HRP, HTP e/ou MCNR. Segundo Volkaman *et al.* (1992), as concentrações de HTP em sedimentos estuarinos e intertidais considerados não poluídos geralmente estão em torno de $10 \mu\text{g g}^{-1}$, embora este valor possa ser 2 ou 3 vezes maior em locais com entradas significativas de n-alcenos derivado de ceras de vegetais superiores. Sedimentos marinhos ricos em matéria orgânica podem conter até $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de HTP, mas concentrações maiores que esta são normalmente associadas com

entradas de petróleo (Readman *et al.*, 2002). No presente estudo, as estações PB01 e PB03 em ambos os meses de coleta, e PB04 apenas no mês de abril, são consideradas como poluídas, pois possuem concentrações acima de $250 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco). Em geral, a presença de MCNR em cromatogramas de hidrocarbonetos alifáticos está associada com resíduos de petróleo degradado ou intemperizados (Readman *et al.*, 2002) e é um bom indicador de poluição por óleo (Volkman *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1995; Nishigima *et al.*, 2001). Porém, concentrações de MCNR $< 10 \mu\text{g g}^{-1}$ são comuns em ambientes marinhos costeiros distante de fontes de hidrocarbonetos petrogênicos (Jeng, 2007). No presente estudo, apenas uma estação (PB02 no mês de outubro) apresentou concentração de MCNR $< 10 \mu\text{g g}^{-1}$, indicando que a área possui uma importante contribuição de óleo.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, as PLs de *L. vannamei* não exibiram efeitos letais ou subletais decorrentes da exposição aos sedimentos do estuário do Rio São Paulo. Porém, estudos anteriores utilizando *Artemia* sp., embriões de *Echinometra lucunter* e juvenis de ostras *Cassostrea rhizophorae* na BTS indicaram possível contaminação em todas as áreas da indústria do petróleo (Nascimento *et al.*, 1998a, 1998b, 2000). Sant Anna Júnior (2007), ao estudar bioacumulação de hidrocarbonetos de alta e baixa massa molecular em moluscos bivalves na porção norte da BTS verificou concentrações elevadas de hidrocarbonetos de alta massa molecular nos tecidos dos mesmos.

Evangelista *et al.* (2005) utilizando PL de *L. vannamei* para avaliar a toxicidade de sedimentos da BTS observaram uma redução no peso seco das PLs mesmo com as análises químicas apontando baixa concentração de hidrocarbonetos. Redução semelhante de peso foi percebida no camarão de água doce *Macrobrachium borelli* exposto à fração solúvel de petróleo pela ocorrência de um mecanismo de ativação de enzimas atuantes no metabolismo de lipídios (Lavarias *et al.*, 2006). Este mecanismo foi verificado em todos os estágios de vida do organismo sem que houvessem diferenças entre os mesmos, sugerindo que estes organismos passam estar enfrentando uma necessidade crescente de energia, para lidar com a situação do estresse provocada por hidrocarbonetos. Tal redução, não foi observada no presente estudo, sugerindo que os contaminantes estejam abaixo dos níveis que causam efeito no *L. vannamei*.

Em relação às duas espécies utilizadas no presente estudo, pôde-se observar que o copépodo apresenta maior sensibilidade quando comparado ao camarão, uma vez que o último não apresentou nenhum efeito, letal ou subletal. Em uma revisão sobre poluição e meiofauna, Coull e Chandler (1992) comentam sobre a sensibilidade de copépodos, em especial aos meiobetônicos, à poluição caracterizada por óleos e combustíveis. Estes organismos foram comparados em estudos de campo a outros grupos da meiofauna, como nematoda, tendo, os copépodos, apresentado maior sensibilidade e uma recuperação mais lenta a este tipo de poluição que o outro grupo. O autor cita um dos casos mais estudados de

derramamentos de óleo, o AMOCO Cadiz, em 1978 na França, o qual resultou em reduções significativas nas densidades de copépodos em áreas de infralitoral em um curto prazo. No presente estudo, os resultados obtidos a partir de ensaios em laboratório com copépodo e PL de camarão, corroboram com o estudo citado anteriormente, onde a sensibilidade superior foi observada com copépodo em relação a pós-larva do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Quanto à sensibilidade de Penaeidae, embora seja considerada uma das famílias de crustáceos estuarinos mais sensíveis, é necessário considerar o tipo e a forma do contaminante ao qual o organismo será exposto e também a fase de vida entre outros fatores. Cripe (1994) comparando a sensibilidade de PLs de *Penaeus duorarum* e o misidáceo *Mysidopsis Bahia*, concluiu que os peneídeos apresentaram maior sensibilidade quando expostos a organoclorados e organofosfatos, entretanto, os misidáceos foram mais sensíveis quando expostos a piretróides e metais.

Os resultados do presente estudo mostraram que a PL do camarão marinho *L. vannamei* não apresentou sensibilidade suficiente para indicar diferenças entre a área impactada e a área controle, mesmo com valores moderados de HTP, HRP e MCNR nos pontos PB01 e PB03 em ambos os meses de coleta e PB04 no mês de abril, indicando possível contaminação por óleo. Ao contrário, o copépodo *Tisbe biminiensis* indicou toxicidade subletal dos sedimentos coletados em alguns pontos do estuário do Rio São Paulo na BTS, principalmente no ponto PB03. Correlações negativas significativas observadas entre os efeitos subletais do copépodo e HTP, HRP e MCNR, sugere que o copépodo pode ser um bom organismo para indicar contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. O copépodo *T. biminiensis* também se mostrou como um organismo mais sensível a este tipo de contaminação do que a PL do camarão *L. vannamei*.

8. CONCLUSÕES

- O copépodo *Tisbe biminiensis* é um organismo promissor para ser usado em testes de toxicidade com sedimento lamoso, pois não apresentou variação na sobrevivência ou fecundidade quando expostos ao sedimento estuarino não contaminado, é uma espécie generalista quanto à granulometria e apresenta constância nos testes com substância de referência.
- A Baía de Suape, em 2003, foi uma área com baixo potencial para causar efeitos tóxicos sobre organismos em relação às concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.
- O *T. biminiensis* mostrou-se sensível quando exposto ao sedimento da Baía de Suape, o qual apresentou alta mortalidade no ponto localizado no estuário do rio Massangana durante o período seco de 2003.
- Correlações significativas positivas foram observadas entre a mortalidade e os n-alcanos e o $\Sigma(C_{21}-C_{34})$. Apesar dessas correlações significativas, não podemos descartar a possibilidade da ocorrência de outros contaminantes na área, principalmente os ligados à agricultura, uma vez que a área apresenta um longo histórico de cultivo de cana de açúcar.
- *T. biminiensis* apresentou efeitos subletais quando exposto aos sedimentos do Porto Interno de Suape e do Estuário do Rio Ipojuca coletados no período de abril de 2005 a janeiro de 2006. Os meses de julho, para o Porto Interno de Suape, e agosto, para o Estuário do Rio Ipojuca, foram os mais críticos para o período amostrado, provavelmente relacionado com contaminantes trazidos dos rios durante o período chuvoso.
- As baixas concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos podem estar relacionadas com a ausência de toxicidade letal em *T. biminiensis*. Porém pode-se observar uma elevação na concentração de metais pesados ao longo do tempo, bem como a substituição de sedimentos mais finos (<63 μm) por areia.
- Não foram encontradas correlações significativas entre a toxicidade e os metais, hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos dos sedimentos coletados no Porto Interno de Suape e no Estuário do Rio Ipojuca no período de abril de 2005 a janeiro de 2006. Desta forma, esses efeitos subletais observados podem estar relacionados com outros tipos de contaminantes trazidos através dos rios durante o período chuvoso ou a interação de vários contaminantes.

- A Baía de Suape é uma área que apresenta uma elevação na toxicidade dos sedimentos ao longo do tempo e, por isso, necessita de mais pesquisas para que medidas mitigadoras possam ser tomadas com intuito de minimizar impactos sobre esse ecossistema.
- Os sedimentos coletados no estuário do rio São Paulo não causaram efeito letal para *T. biminiensis* ou *L. vannamei*. Essa ausência de letalidade indica a baixa disponibilidade de contaminantes para as espécies utilizadas como organismos teste.
- Embora não tenham ocorrido diferenças significativas na mortalidade de *T. biminiensis* quando expostos aos sedimentos coletados no estuário do rio São Paulo e o controle (Maracaípe-PE), duas amostras do ponto PB03 coletadas em março apresentaram mortalidade superior a 80%, sugerindo um efeito tóxico pontual, que pode ter tido relação com a presença de manchas de óleo na área de coleta.
- Análises indicaram correlações significativas entre os efeitos subletais observados com o copépodo e com os HRP, HTP e MCNR, indicando que quanto maior a concentração desses contaminantes maiores são os efeitos.
- Quando comparamos os resultados toxicológicos do copépodo *T. biminiensis* e da PL do camarão *L. vannamei*, observa-se que o copépodo é mais sensível, pois apresentou efeitos subletais nos pontos PB01, PB03 e PB04 no mês de março, e PB03 no mês de outubro.
- O *T. biminiensis* se mostrou, neste estudo, como um bom organismo para ser empregado em testes ecotoxicológicos de rotina utilizando sedimento lamoso. Além da constância nos resultados de CL_{50} com o dicromato de potássio e por não ter preferência por determinado tamanho de grão, ele é um organismo que há muito tempo vem sendo cultivado em laboratório, atinge uma alta densidade populacional facilitando a realização de testes que necessitam de uma grande quantidade de indivíduos, seu pequeno tamanho faz com que a realização dos testes fique mais barata, e seu hábito epibentônico permite testar poluentes associados ao sedimento como também dissolvidos na coluna d'água.

9. Referências Bibliográficas

- ABEL, P.D., AXIAK, V. 1991. Ecotoxicology and the marine environmental. First published in 1991 by Ellis Horwood Limited, England. 268p.
- ABESSA, D.M.S., SOUZA, E.C.P.M., TOMMASI, L.R., 2006. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia (Fortaleza)*. 19: 269-277.
- ABESSA, D.M.S.; SOUZA, E.C.P.M., 2003. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* to K₂Cr₂O₇. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(1): 53-55.
- ALLEN, H.E.; EU, G.; DENG, B., 1993. Analysis Acid-volatile Sulfid (AVS) and Simultaneously Extracted Metals (SEM) for the Stimulation of Potential Toxicity in Aquatic Sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1441–1453
- ARAGÃO, M.A., ARAÚJO, R.P.A., 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações*. (eds) São Carlos, Rima Editora, 117-152.
- ARAÚJO, R.J.V., 2008. Avaliação toxicológica do complexo estuarino de Suape – PE utilizando o pluteus do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* Lamarck (1816). Dissertação de Mestrado em Oceanografia UFPE. 59p.
- ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P., 2005. Are the diatoms *Navícula* sp. and *Thalassiosita fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 327: 58-69.
- BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A., 2002. Testes de toxicidade aguda com misidáceos – ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustácea: Mysidacea). In: NASCIMENTO. I. A.; SOUSA E. C. P. M.; NIPPER. M. (Ed.) *Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria, 262p.
- BAT, L., RAFFAELLI, D., 1998. Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 217-239.
- BEJARANO, A.C., CHANDLER, G.T., 2003. Reproductive and developmental effects of a atrazine on the stuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 3009-3016.

- BEJARANO, A. C.; MARUYA, K. A.; CHANDLER, G. T. 2004. Toxicity assessment of sediments associated with various land-uses in coastal South Carolina, USA, using a meiobenthic copepod bioassay. *Mar. Poll. Bull.* 49: 23-32.
- BENGTSSON, B.E. 1978. Use of a Harpacticoid Copepod in Toxicity tests. *Mar. Pollut. Bull.* 9: 238-241.
- CELINO, J.J.; QUEIROZ, A. F. S. 2006. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. *REM: R. Esc. Minas.* 59(3): 265-270.
- CESAR, A., MARÍN, A., MARÍN-GUIRAO, L., VITA, R., 2004. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: The case of Portmán Bay. *Sci. Mar.* 68: 205-213.
- CHAGAS, A.C.O., 2003. Níveis de metais pesados e hidrocarbonetos em sedimentos do Complexo Industrial Portuário de SUAPE – PE – Brasil. Dissertação de Mestrado em Oceanografia UFPE. 80 p.
- CHAPMAN, P.M., 1998. Marine sediment toxicity tests. ASTM, Philadelphia.
- CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente / Ministério do Meio Ambiente), 2004. *Resolução No. 344*, de 25 de março de 2005, Site: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res04/res34404.xml>
- COSTA-LOTUFO, L.V., 2008. Princípios fundamentais na avaliação de novas metodologias em ecotoxicologia marinha. Palestra apresentada no X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Bento Gonçalves, abril-maio 2008.
- COULL, B.C.; CHANDLER, G.T. 1992. Pollution and meiofauna: Field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 30: 191-271.
- CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos), 2003. Levantamento das fontes poluidoras na bacia do Rio Ipojuca – Pernambuco. Pernambuco, Recife, Maio de 2003. 53p.
- CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos), 2006. Site: http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/qualidade_oceano.pdf
- CRA (Centro de Recursos Ambientais), 2001. Avaliação da Qualidade das Águas Costeiras superficiais. Relatório Técnico.
- CRA (Centro de Recursos Ambientais), 2002. Avaliação da Qualidade das Águas Costeiras superficiais. Relatório Técnico.
- CRIFE, G. 1994. Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis bahia* and postlarval *Penaeus duorum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1867-1872.

- da SILVA, E. M.; PESO-AGUIAR, M. C.; NAVARRO, M. F. T., CHASTINET, C. B. A. 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(1): 102–118.
- da SILVA, T.F., AZEVEDO, D.A., AQUINO-NETO, F.R., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(3): 628-637.
- DAWES, D.J., 1997. *Marine Botany*. United States of America. 2nd ed., 303-337.
- DeWITT, T.H.; REDMOND, M.S.; SEWALL, J.E.; SWARTZ, R.C. Development of a chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods. Contribution No. N-240, USEPA/ERL—Narragansett, 1992.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992. Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. Report EPS 1/RM/26. Environment Canada, Ottawa.
- EVANGELISTA, A.J.A., NASCIMENTO, I.A., PEREIRA, S.A., LOPES, M.B.N.L., MARTINS, L.K.P., FILLMAN, G., 2005. Assessing the potential toxicity of marine sediments found in-petroleum industry áreas: A new approach base don responses of postlarval shrimp. *Cienc. Mar.* 31: 43-55.
- FADE, 2006. Refinaria do Nordeste – Abreu e Lima. Relatório de Impacto Ambiental. 77p.
- FARAPONOVA, O.; DE PASCALE, D.; ONORATI, F.; FINOIA, M. G. 2005. *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*. 14: 91-95.
- FARMER, J.G., GIBSON, M.J., 1981. Direct determination of cadmium, chromium, copper and lead in siliceous standard reference materials from a fluoroboric acid matrix by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atom. Spectrosc.* 2: 176-181.
- FELIZZOLA, J.F., 2005. Especialização de compostos butílicos de estanho em sedimentos superficiais da Baía de Todos os Santos. Dissertação de Mestrado. PUC-RJ. 121p.
- FERNANDES, L. M. B., 1999. Estudos toxicológicos na área do complexo industrial portuário de Suape (PE). Convênio Complexo Industrial de Suape/ Fundação Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Oceanografia-Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 60 p.
- GRAY, J.S., 1982. Effects of pollutants on marine ecosystems. *Netherlands Journal of Sea Research*, 16: 424-443.
- GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L.; Chanley, M. H. (Eds). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press. N. Y., 26-60.

- GUNKEL, G., KOSMOL, J., SOBRAL, M., ROHN, H., MONTENEGRO, S., AURELIANO, J., 2006. Sugar cane industry as a source of water pollution – case study on the situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil. *Water Air Soil Pollut.*
- HAGOPIAN-SCHLEKAT, T., CHANDLER, G.T., SHAW, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51: 247-264.
- HAMILTON, M.A., RUSO, R.C., THURSTON, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Envir. Sci. Technol.* 11: 714-719.
- HERRERO, R., LODEIRO, P., ROJO, R., CIORBA, A., RODRÍGUEZ, P., DE VICENTE, MANUEL E. S., 2008. The efficiency of the red alga *Mastocarpus stellatus* for remediation of cadmium pollution. *Bioresource Technology*, 99: 4138–4146.
- HAGOPIAN-SCHLEKAT, T., CHANDLER, G.T., SHAW, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51: 247-264.
- HUTCHINSON, T.H.; POUND, N.A.; HAMPEL, M.; WILLIAMS, T.D. 1999. Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18: 2914-2920.
- INGERSOLL, C.G., 1995. Sediment tests. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, ed. G.M. Rand, Taylor and Francis, Academic Press, New York, p. 231-255.
- ISO 14669, 1999. Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Geneva, Switzerland. First edition. 1999-04-01.
- JENG, W.L., 2007. Aliphatic hydrocarbon concentration in short sediment cores from the southern Okinawa Trough: Implications for lipid deposition in a complex environment. *Continental Shelf Research*, 27: 2066-2078.
- JESUS, H.C., COSTA, E.A., MENDONÇA, A.S.F., ZANDONADE, E., 2004. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória – ES. *Quim. Nova*. 27(3): 378-386.
- KENNISH, M.J., 1997. Pollution impacts on marine biotic communities. *Marine Science Series*. CRC Press., 308p.
- KERSTEN, M., FÖRSTNER, U., 1989. Speciation of trace elements in sediments. In: Batley, G.E. (Ed.), *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. CRC Press, Boca Raton, 350p.

- KOENING, M.L., ESKINAZI-LEÇA, E., NEUMANN-LEITÃO, S., MACÊDO, S.J., 2003. Impacts of the construction of the Port of Suape on phytoplankton in the Ipojuca river estuary (Pernambuco-Brazil). *Braz. Arch. Biol. Techn.* 46: 73-81.
- LARKUM, A.W.D., ORTH, R.J., DUARTE, C.M., 2006. *Seagrass: Biology, Ecology and Conservation*. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg, 691 p.
- LARRAIN, A., SOTO, E., SILVA, J., BAY-SCHMITH, E., 1998. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to $K_2Cr_2O_7$ under varying temperature regimes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 391-396.
- LAU, S.S.S., CHU, L.M., 1999. Contaminant release from sediments in a coastal wetland. *Wat. Res.* 33(4): 909-918.
- LAVARÍAS, S.; POLLERO, R.J.; HERAS, H. 2006. Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquatic Toxicology*. 77: 190–196
- LESSA, G. C.; LIMA, G. M.; CARVALHO, J. B.; OLIVEIRA, V. 2000. *Oceanografia física e Geologia da BTS*. Site: <http://www.cpgg.ufba.br>.
- LONG, E.R., MACDONALD, D.D., SMITH, S.L., CALDER, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19: 81-97.
- LORENZON, S., FRANCESE, M., SMITH, V.J., FERRERO, E.A., 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immun.* 11: 459-472.
- LORING, D.H., RANTALA, R.T.T., 1992. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Sci. Rev.* 32: 235-283.
- LOTUFO, G.R., ABESSA, D.M.S., 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M., *Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações para o Brasil*. São Paulo, Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 262p.
- LOTUFO, G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Mar. Environ. Res.* 44: 149-166.
- LOTUFO, G.R., 1998a. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. *Aquat. Toxicol.* 44: 17-30.

- LOTUFO, G.R.; FLEEGER, J.W. 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 151: 91-102.
- MACKEN, A., GILTRAP, M., FOLEY, B., McGOVERN, E., McHUGH, B., DAVOREN, M., 2008. A model compound study: The ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassay. *Environmental Pollution*, 153: 627-637.
- MARTINS, L.K.P., NASCIMENTO, I.A., FILMANN, G., KING, R., EVANGELISTA, A.J.A., READMAN, J.W., DEPLEDGE, M.H., 2005. Lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of chronic petroleum pollution at Todos os Santos Bay, Brazil. *Environ. Res.* 99, 387-396.
- McCREADY, S.; BIRCH, G.F.; LONG, E.R., 2006. Metallic and organic contaminants in sediments of Sydney Harbour, Australia and vicinity – A chemical dataset for evaluating sediment quality guidelines. *Environ. Internat.*, 32: 455-465.
- MEDEIROS, P.M., BÍCEGO, M.C., 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP – Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 892-899.
- MELO, S. L. R.; ABESSA, D. M. S. 2002. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando anfípodos. In: NASCIMENTO. I. A.; SOUSA E. C. P. M.; NIPPER. M. (Ed.) *Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria. 262p.
- MELO, S.L.R., NIPPER, M., 2007. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyischnopidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66: 412-420.
- MILIOU, H., VERRIOPOULOS, G., MAROULS, D., BOULOUKUS, D., MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M., 2000. Influence of life-history adaptations on the fidelity of laboratory bioassays for the impact of heavy metals (Co^{2+} and Cr^{6+}) on tolerance and population dynamics of *Tisbe holoturiae*. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 352-359.
- MORE, C.G., BETT, B.J., 1989. The use of meiofauna in marine pollution impact assessment. *Zool. J. Linn. Soc.* 96: 263-280.
- MOZETO, A.A., ZAGATTO, P.A., 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações*. (eds) São Carlos, Rima Editora: 15-38.
- NASCIMENTO, I. A.; EVANGELISTA, A. J. A. 2002. Testes de toxicidade com sedimento usando-se pós-larvas de camarões *Litopenaeus* sp. (Crustácea; Decapoda). In:

NASCIMENTO, I. A.; SOUSA E. C. P. M.; NIPPER, M. (Ed.) Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria. 262p.

NASCIMENTO, I.A., SMITH, D.H., PEREIRA, S.A., ARAUJO, NASCIMENTO, I.A., SMITH, D.H., PEREIRA, S.A., LEITE, M.B.N.L., SANSONE, G., 1998a. The use of different organisms and biological levels to determine water and sediment quality at industrial sites. *Cuad. Invest. Biol.* 20 (1): 339–349.

NASCIMENTO, I.A., LEITE, M.B.N.L., SANSONE, G., PEREIRA, S.A., SMITH, D.H., 1998b. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. *J. Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 1 (1): 101–108.

NASCIMENTO, I. A.; SMITH, D. H.; PEREIRA, S. A.; ARAUJO, M. M. S.; SILVA, M. A.; MARIANI, A. M. 2000. Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 3: 449–458.

NEUMANN-LEITÃO, S., MATSUMURA-TUNDISI, T., 1998. Dynamics of a perturbed estuarine zooplanktonic community: Porto f Suape, PE, Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1981-1988.

NIPPER, M., 2000. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective. *Aquat. Ecosys. Health Manage.* 3: 433-447.

NISHIGIMA, F.N., WEBER, R.R., BÍCEGO, M.C., 2001. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 42(11): 1064-1072.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). http://response.restoration.noaa.gov/book_shelf/122_squirt_cards.pdf

OLIVEIRA, O. M. C. de; TRIGÜIS, J.A.; QUEIROZ, A. F. de S.; SOUSA, E. S. de; CELINO, J. J.; CERQUEIRA, D.S. 2005. Atividades de Biorremediação em Zonas de Manguezal Afetadas por Atividades Petrolíferas na Baía de Todos os Santos - Bahia. In: I Congresso Internacional PIATAM, 2005, Manaus-AM. Livro de Resumos do I Congresso Internacional PIATAM, p. 248-248.

PANDEY, P.K., VERMA, Y., CHOUBEY, S., PANDEY, M., Chandrasekhar, K., 2008. Biosorptive removal of cadmium from contaminated groundwater and industrial effluents. *Bioresource Technology*, 99: 4420–4427.

PINTO, C.S.C.; SOUZA-SANTOS, L.P.; SANTOS, P.J.P., 2001. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, 198: 253-267.

- POUNDS, N.A., HUTCHINSON, T.H., WILLIAMS, T.D., WHITING, P., DINAN, L., 2002. Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. *Mar. Environ. Res.* V. 54: 709-713.
- RAISUDDIN, S., KWOK, K.W.H., LEUNG, K.M.Y., SCHLENT, D., LEE, J.S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*, 83: 161-173.
- RANTALLA, R.T.T., LORING, D.H., 1987. Cadmium in marine sediments: determination by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, vol. 3. ICES Copenhagen.
- READMAN, J.W., FILLMANN, G., TOLOSA, I., BARTOCCI, J., VILLENEUVE, J.P., CATINNI, C., MEE, L.D., 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 48-62.
- RODGHER, S., ESPÍNDOLA, E. L. G., ROCHA, O., FRACÁCIO, R., PEREIRA, R. H. G., RODRIGUES, M. H. S., 2005. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the tietê river (São Paulo, Brazil). *Braz. J. Biol.*, 65(4): 697-710.
- SANT'ANNA Jr., N. 2007. Evolução temporal e distribuição espacial de hidrocarbonetos petrogênicos na baía de Todos os Santos e litoral norte da Bahia. Salvador. Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. 188p.
- SEVILLA, B. B.; RAMÍREZ, L. F. B.; RODRÍGUEZ, M. H. 2004. Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, in a recirculating seawater system. *Ciencias Marinas*. 30 (1B): 179-188.
- SILVA, E.M., CHASTINET, C.B.A., NAVARRO, M.F.T., BARROS, A.F., CAVALCANTE, P., MOTA, M.F.V., 2000. Utilização de ensaios de ecotoxicidade com *Tisbe holothuriae* (Copepoda: Harpacticoida) em programas de avaliação da toxicidade de efluentes complexos. In: Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira Neto, A.L. *Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI*. (eds) São Carlos, Rima Editora: 451-460.
- SILVA JÚNIOR, J.M., 2008. Geoquímica de metais pesados em sedimentos superficiais do Complexo Industrial Porto de Suape – PE – Brazil. Monografia apresentada ao Centro de Biociência e Biotecnologia da UENF. 29p.
- SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A., SÁFADI, R., FONTES, A., MOREIRA, J. 2004. Ensaios ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: Resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente. Rio de Janeiro, 20 a 22 de setembro de 2004.

- SOUSA, E.C.P.M., 2002. Toxicologia marinha: Histórico. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M., Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações para o Brasil. São Paulo, Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 9-14.
- SOUZA-SANTOS, L.P., Santos, P.J.P., CASTEL, J., 1999. Development and population dynamics of *Amonardia normani* Brady reared on axenic and non-axenic diatoms. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 235: 167-182.
- SOUZA-SANTOS, L.P., PASTOR, J.M.O., FERREIRA, N.G., COSTA, W.M., ARAÚJO-CASTRO, C.M.V., SANTOS, P.J.P., 2006. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. Aquac. Res. 37: 1516-1523.
- SUGUIO, K., 1973. Introdução a sedimentologia. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo. 317p.
- TAYLOR, R.L., CALDWELL, G.S., DUNSTAN, H.J., MATTHEW, G.B., 2007. Short-term impacts of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms on the harpacticoid copepod, *Tisbe holothuriae*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 341: 60-69.
- THOMAS, K.V.; BARNARD, N.; COLLINS, K.; EGGLETON, J., 2003. Toxicity characterization of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. Chemosphere, 53: 1105-1111.
- THOTILL, I.E., TURNER, A.P.F., 1996. Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. Trends in Analytical Chemistry, 15 (5): 178-188.
- TURESSON, E.U., STIERNSTRÖM, S., MINTEN, J., ADOLFSSON-ERICI, M., BENGTSSON, B.E., BREITHOLTZ, M., 2007. Development and reproduction of the freshwater harpacticoid copepod *Attheyella crassa* for assessing sediment-associated toxicity. Aquatic Toxicology, 83: 180-189.
- US EPA., 1998. Short term methods for estimating the chronic toxicity and effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA/600/4-87/028.
- VEIGA, I. G. 2003. Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos / Bahia. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química. 249p.
- VOLKMAN, J. K.; HOLDSWORTH, D. G.; NEILL, G. P.; BAVOR Jr., H. J. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. The Science of the Total Environment, 112: 203-219.
- VOLKMANN, B., 1979. *Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida) species from Bermuda and zoogeographical considerations. Arch. Oceanogr. Limnol. 19: 1-76.

- VOLKMANN-ROCCO, B. 1973. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the Gracilis group. Arch. Oceanogr. Limnol. 18: 71-90.
- WERNERSSON, A.S., DAVE, G., NILSSON, E., 2000. Assessing pollution and UV-enhanced toxicity in Torsviken, Sweden, a shallow bay exposed to contaminated dredged harbor sediment and hazardous waste leachate. Aquat. Ecos. Health Manage. 3: 301-316.
- WILLIAMS, T.D., JONES, M.B., 1999. Effects of temperature and food quantity on the reproduction of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 236: 273-290.
- WOLGEMUTH, K. M.; BURNETT, W.; CAND MOURA, P.L. 1981. Oceanography and suspended material in Todos os Santos Bay. Ver. Bras. Geoc. 11(3): 172-178.
- ZABETOGLU, K., VOUTSA, D., SÂMARA, C., 2002. Toxicity and heavy metal contamination of surficial sediments from the Bay of Thessaloniki (Northwestern Aegean Sea) Greece. Chemosphere. 49: 17-26.
- ZAGATTO, P.A., 2006. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações. (eds) São Carlos, Rima Editora: 1-13.
- ZAMBONI, A. J.; COSTA, J. B. 2002. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando tanaidáceos. In: NASCIMENTO. I. A.; SOUSA E. C. P. M.; NIPPER. M. (Ed.) Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria. 262p.
- ZANARDI, E.; BÍCEGO, M. C.; MIRANDA, L. B.; WEBER, R. R. 1999. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. Mar. Poll. Bull. 4 (38): 261-267.
- ZARONI, L. P. 2002. Teste de toxicidade com embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus 1758). In: NASCIMENTO. I. A.; SOUSA E. C. P. M.; NIPPER. M. (Ed.) Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria. 262p.