

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

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA ÁGUA E UTILIZAÇÃO DE
DIFERENTES MÉTODOS NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
SEDIMENTOS DO COMPLEXO ESTUARINO DE SUAPE, PE,
BRASIL.**

RODOLFO JORGE VALE DE ARAÚJO

Recife - PE
Maio, 2008

MESTRADO EM OCEANOGRAFIA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA ÁGUA E UTILIZAÇÃO DE
DIFERENTES MÉTODOS NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
SEDIMENTOS DO COMPLEXO ESTUARINO DE SUAPE, PE,
BRASIL.**

RODOLFO JORGE VALE DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Orientadora: Prof. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

Recife - PE
Maio, 2008

A663a Araújo, Rodolfo Jorge Vale de..

Avaliação toxicológica da água e utilização de diferentes métodos na avaliação toxicológica de sedimentos do complexo estuarino de Suape, PE, Brasil / Rodolfo Jorge Vale de Araújo. – Recife: O Autor, 2008.

67 f.; il., tabs.

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Lília Pereira de Souza Santos.

Inclui Referências Bibliográficas.

1. Oceanografia. 2. Toxicologia da água. 3.Sedimentos – Toxicologia. 4.Complexo Estuarino de Suape (PE). I. Título.

551.46 CDD (22.ed.)

UFPE/BCTG/2010-114

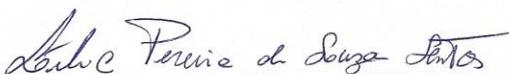
MESTRADO EM OCEANOGRAFIA

Rodolfo Jorge Vale de Araújo

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA ÁGUA E UTILIZAÇÃO DE
DIFERENTES MÉTODOS NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
SEDIMENTOS DO COMPLEXO ESTUARINO DE SUAPE, PE, BRASIL.**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 30 de maio de 2008.

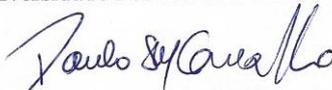
EXAMINADORES



Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Dra. Monica Ferreira Costa
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Paulo Sergio Martins de Carvalho
Universidade Federal de Pernambuco

SUPLENTES

Profa. Dra. Carmem Medeiros Limongi
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edmilson Santos de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Recife - PE
Maio, 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais essa vitória e por estar sempre presente em minha vida;

À Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos, pela orientação, conselhos e pelos ensinamentos adquiridos neste período de convívio e a todos que fazem parte do LACE: Cristiane M. V. de Araújo Castro, Aurelyanna C. B. Ribeiro, Lílian Cristine, Deloar e Anny Gabrieli, pelo apoio constante e amizade;

À Profa. Dra. Monica Costa, pelo apoio e ajuda com o material bibliográfico;

À Profa. Dra. Kátia Muniz, Prof. Dr. Manoel de Jesus F. Montes, Prof. Dr. Silvio Macêdo, Felipe, Iara e Joseane pelo apoio, fornecimento de material e pelas análises feitas para realização deste estudo;

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Oceanografia – UFPE;

Ao CNPq pela concessão de uma bolsa de estudos, sem a qual este trabalho não seria realizado.

Ao Estaleiro Atlântico Sul pelo apoio e financiamento durante todo o período de realização do presente estudo;

À empresa Aqualider, pela doação da água do mar tratada utilizada nos testes com os controles e nos testes com a substância de referência;

À minha namorada Danielle Viana, pelo apoio, incentivo, companheirismo, bons conselhos nas horas certas e, principalmente, por estar sempre disponível a me ajudar a qualquer hora. Também por sempre estar presente nos mergulhos e por me ajudar na parte de laboratório e na correção da parte escrita deste trabalho;

Aos meus pais: Alfredo R. Beuttenmüller de Araújo e Hulda Vale de Araújo, pelo apoio, incentivo e amor dedicados a mim;

Aos meus irmãos: André e César Vale de Araújo, por estarem sempre presentes;

Ao amigo e Arquiteto Theo de Carvalho, pela amizade, paciência e, principalmente, pela ajuda com “o meu computador”;

Ao amigo e Advogado Leonardo Caldas, pela amizade e disposição para me ajudar nos mergulhos para coleta dos ouriços-do-mar e nas coletas de sedimento.

RESUMO GERAL

No Complexo Estuarino de Suape – PE está instalado o Complexo Porto-Industrial de Suape, implantado na região entre os anos de 1979 e 1980. Sua construção provocou profundas alterações nas condições geomorfológicas e hidrológicas da área. O objetivo principal do presente estudo foi avaliar se as águas superficiais do Complexo Estuarino de Suape – PE apresentam sinais de poluição por substâncias tóxicas e realizar uma avaliação toxicológica do sedimento utilizando as metodologias da fase sólida, do elutriato e da interface sedimento/água. Em um primeiro momento, foi utilizado o método de análise da toxicidade com o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Seis pontos de coleta foram estabelecidos entre os estuários dos rios Massangana e Tatuoca. As amostras de água superficial do local foram coletadas nos meses de maio, agosto, outubro e dezembro de 2007. A análise das amostras evidenciou que a toxicidade entre os seis pontos examinados variou de acordo com o mês e o regime das marés, sendo maior no mês de outubro, quando a toxicidade nos seis pontos foi significativa. Os efeitos tóxicos encontrados provavelmente foram originados por influência das águas do rio Massangana. Em um segundo momento, o presente estudo avaliou as respostas obtidas para o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* e para a sobrevivência e fecundidade do Copepoda *Tisbe biminiensis*, nas metodologias da fase sólida (sedimento integral), do elutriato e da interface sedimento-água. O sedimento controle foi coletado no estuário do rio Maracaípe (Ipojuca – PE) e o sedimento teste foi coletado no estuário do rio Massangana (Suape – PE), nos meses de outubro e dezembro de 2007. Os testes utilizando o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, não puderam ser validados, pois o percentual de indivíduos em estágio de larva pluteus, no controle, foi abaixo do exigido pelas normas técnicas consultadas. Os testes revelaram que nenhuma das metodologias utilizadas evidenciou efeito letal na sobrevivência de *T. biminiensis*, e apenas a metodologia da fase sólida evidenciou efeitos subletais na fecundidade e no número de copepoditos na prole. As metodologias do elutriato e da interface sedimento-água não evidenciaram qualquer efeito tóxico do sedimento testado (seja agudo ou crônico) em *T. biminiensis*, porém, existiram diferenças significativas nas médias entre as metodologias. Os resultados do presente estudo sugerem que substâncias tóxicas estejam ligadas às partículas finas do sedimento (fração sólida < 63µm) e que substâncias tóxicas, tais como a amônia não-ionizada, podem ser disponibilizadas à água sobrejacente.

Palavras-chave: Ouriço-do-mar, Suape, *Tisbe biminiensis*, toxicidade, sedimento.

GENERAL ABSTRACT

In Estuarine Complex of Suape (Brazil – PE) is installed the Suape Harbor and industry complex, deployed in the region between the years 1979 and 1980. This complex is responsible for alterations in the geomorphologic and hydrologic conditions of the area. The main objective of this study was to assess whether the surface waters of the Estuarine Complex of Suape (Brazil – PE) shows signs of pollution by toxic substances and perform a toxicological assessment of sediment using the methods of the solid phase, elutriate and sediment-water interface. In a first moment, was used the toxicity analysis method with the embryolarval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Six sampling sites were established between the estuaries of the Massangana and Tatuoca Rivers. The surface water samples from the sites were collected in the months of May, August, October and December 2007. The samples analysis showed that the toxicity among the six sites varied according with the month and tidal regime, being higher in October, when the toxicity in the six points was more significant. The highest toxicity was probably related to the input of waters of Massangana River. In a second moment, the present study evaluated the responses obtained for the embriolarval development of *L. variegatus* and the survival and fecundity of the copepod *Tisbe biminiensis* in the methodologies of the solid phase (whole sediment), elutriate and sediment-water interface. The control sediment was collected in the estuary of the Maracaípe River (Ipojuca – PE) and sediment testing was collected in the estuary of the Massangana River (Suape – PE), in October and December 2007. The tests using embryolarval development of *L. variegatus* could not be validated because the percentage of individuals in pluteus larval stage in the controls, was lower than required by the technical standards consulted. The tests revealed that any of the methods used showed lethal effect on survival of *T. biminiensis*, and only the methodology of solid phase showed sublethal effects on fecundity and the number of copepodites in the offspring. The methodologies of elutriate and interface sediment-water did not show any toxic effect of sediment tested (either acute or chronic) for *T. biminiensis*, however, there were significant differences between the average of the methodologies. The results of this study suggest that toxic substances may be linked to fine particles of sediment (solid fraction < 63 µm) and toxic substances, such as ammonia non-ionized, may be available to the overlying water.

Key-words: Sea urchin, Suape, *Tisbe biminiensis*, toxicity, sediment.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
CAPÍTULO 1 - Avaliação Toxicológica da Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape – PE Utilizando o Desenvolvimento Embrionarval do Ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>.	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Objetivos Específicos.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Área de Estudo.....	7
3.2. Coleta das Amostras.....	8
3.3. Coleta dos Espécimes.....	9
3.4. Água de Diluição Marinha.....	9
3.5. Processo de Extração dos Gametas.....	9
3.6. Processo de Fecundação.....	11
3.7. Ensaio com a Substância de Referência (DSS).....	12
3.8. Ensaio com a Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape (CES).....	12
3.9. Incubação, Encerramento e Leitura do Teste.....	12
3.10. Análise dos Dados.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Parâmetros Físico-Químicos da Água e Pluviometria do CES.....	15
4.2. Ensaio de Toxicidade.....	16
4.2.1. Ensaio com a Substância de Referência (DSS).....	16
4.2.2. Ensaio com a Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape (CES).....	18
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	29
7. BIBLIOGRAFIAS	30

CAPÍTULO 2 - Avaliação Toxicológica de Sedimentos Utilizando o Echinodermata <i>Lytechinus variegatus</i> e o Copepoda <i>Tisbe biminiensis</i> como Organismos-teste em Diferentes Métodos.	34
RESUMO	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Método de Ensaio com <i>Lytechinus variegatus</i>	41
3.2. Cultivo e Manutenção dos Copépodos	41
3.3. Cultivo de Microalgas	41
3.4. Obtenção das Fêmeas de <i>T. biminiensis</i>	42
3.5. Obtenção do Sedimento	42
3.6. Testes com o Sedimento	43
3.7. Parâmetros Físico-Químicos	46
3.8. Análise dos dados	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Parâmetros Físico-Químicos	47
4.2. Testes com <i>Lytechinus variegatus</i> (Outubro de 2007)	47
4.3. Testes com <i>Tisbe biminiensis</i> (Outubro de 2007)	48
4.4. Testes com <i>Tisbe biminiensis</i> (Dezembro de 2007)	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	61
7. BIBLIOGRAFIAS	62

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Avaliação Toxicológica da Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape – PE Utilizando o Desenvolvimento Embrionário do Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

- Figura 1.** Área estudada e pontos de coleta. Estuários dos rios Tatuoca e Massangana. Adaptado de Koenig *et al.*, 2003..... **8**
- Figura 2.** Ovos fertilizados, com destaque da membrana de fertilização (ABNT, 2006)..... **11**
- Figura 3.** Pluteus recém formado no momento do encerramento do teste (CETESB, 1999)..... **13**
- Figura 4.** Total de chuvas (mm) observadas no período de janeiro a dezembro de 2007 e média histórica para região do município do Cabo de Santo Agostinho, estação meteorológica da Barragem de Suape (LAMEPE / ITEP, 2008)..... **15**
- Figura 5.** Média (\pm desvio padrão) do percentual de pluteus não formados de *L. variegatus* em função da concentração de Dodecil Sulfato de Sódio - $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (DSS) em cada um dos 5 bioensaios realizados. Ensaio I = Ensaio Preliminar; Ensaio II = Maio/2007; Ensaio III = Agosto/2007; Ensaio IV = Outubro/2007 e Ensaio V = Dezembro/2007..... **18**
- Figura 6.** Valores (\pm desvio padrão) da CE_{50} em mg/L do Dodecil Sulfato de Sódio - $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (DSS) após 28 horas em cada um dos 5 bioensaios com *L. variegatus* coletados em Muro Alto – PE, Brasil..... **18**
- Figura 7.** Média (\pm desvio padrão) do percentual de pluteus formados de *L. variegatus* no controle e nos pontos de coleta em cada um dos meses de ensaios. As letras a, b e c mostram as diferenças significativas ($p < 0.05$) no teste de Tukey..... **19**
- Figura 8.** Imagem aérea da região mostrando a variação da toxicidade no mês de maio; agosto; outubro e dezembro de 2007. Pontos vermelhos = Tóxico; Pontos verdes = Não Tóxico..... **21**

CAPÍTULO 2 - Avaliação Toxicológica de Sedimentos Utilizando o Echinodermata *Lytechinus variegatus* e o Copepoda *Tisbe biminiensis* como Organismos-teste em Diferentes Métodos.

- Figura 1.** Foto dos recipientes utilizados na metodologia da interface sedimento/água. a) Recipientes de 20 e 60 ml e b) Recipiente de 20 ml, inserido no de 60 ml..... **45**
- Figura 2.** Média (\pm desvio padrão) do total de fêmeas vivas ao final do experimento de outubro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey na estação controle. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água..... **48**
- Figura 3.** Média (\pm desvio padrão) da fecundidade no experimento de outubro de 2007. a, b e c = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as metodologias dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água..... **49**
- Figura 4.** Média (\pm desvio padrão) do número de copepoditos na prole no experimento de outubro de 2007. a, b e c = diferenças encontradas pelo teste de Tukey dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água..... **50**
- Figura 5.** Média (\pm desvio padrão) do total de fêmeas vivas ao final do experimento de dezembro de 2007. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.... **51**
- Figura 6.** Média (\pm desvio padrão) da fecundidade no experimento de dezembro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as metodologias dentro de cada estação de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água..... **52**
- Figura 7.** Média (\pm desvio padrão) do número de copepoditos na prole no experimento de dezembro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água..... **53**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Avaliação Toxicológica da Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape – PE Utilizando o Desenvolvimento Embriolarval do Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas da água superficial no Complexo Estuarino de Suape entre maio e dezembro de 2007..... **16**

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas da água do CES, do controle e da substância de referência nos bioensaios com *L. variegatus*..... **17**

CAPÍTULO 2 - Avaliação Toxicológica de Sedimentos Utilizando o Echinodermata *Lytechinus variegatus* e o Copepoda *Tisbe biminiensis* como Organismos-teste em Diferentes Métodos.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos nos bioensaios com *L. variegatus* e *T. biminiensis* durante os experimentos com os métodos da Fase Sólida (FS), do Elutriato (ELU) e da Interface Sedimento/Água (ISA)..... **47**

CAPÍTULO I

Avaliação Toxicológica da Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape – PE Utilizando o Desenvolvimento Embriolarval do Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

RESUMO

O Complexo Estuarino de Suape está localizado entre os municípios do Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca, distando cerca de 40 km de Recife, capital de Pernambuco. Na área, está instalado o Complexo Porto-Industrial de Suape. Em processo de implantação desde o fim da década de 1970, este complexo é responsável por alterações nas condições geomorfológicas e hidrológicas da área. A implantação de um porto traz não só mudanças físicas, mas químicas também. Isto o torna uma potencial fonte poluidora por substâncias químicas tóxicas. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar se as águas superficiais do Complexo Estuarino de Suape – PE, apresentam sinais de toxicidade subletal baseado no desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* Lamarck (1816). Seis pontos de coleta foram estabelecidos entre os estuários do rio Massangana e Tatuoca. As amostras de água superficial do local foram coletadas nos meses de maio, agosto, outubro e dezembro de 2007. As análises físico-químicas mostraram que a salinidade, pH, temperatura e oxigênio dissolvido, foram similares para todos os pontos. Os resultados evidenciaram que a toxicidade nos seis pontos examinados variou de acordo com o mês e a maré, sendo maior no mês de outubro, quando a toxicidade nos seis pontos foi significativa. Os resultados indicaram que as águas do rio Massangana são as mais prováveis fontes de poluentes para a área estudada neste período.

Palavras-chave: Ouriço-do-mar, Suape, toxicidade, águas superficiais.

1. INTRODUÇÃO

O litoral de Pernambuco apresenta uma extensão de 187 km, incluindo o Complexo Estuarino de Suape, localizado entre os municípios de Cabo de Santo Agostinho (8°17'15.70"S e 35°02'07.13"W) e Ipojuca (8°24'01.40"S e 35°03'51.59"W), distando cerca de 40 km da capital pernambucana, Recife. A área, cortada por diversos rios e riachos, é onde está instalado o Complexo Porto-Industrial de Suape, tendo o início de sua implantação na região, entre os anos de 1979 e 1980, causando alterações nas condições geomorfológicas e hidrológicas da área (Neumann *et al.*, 1998; Souza & Sampaio, 2001; Muniz *et al.*, 2005). Atualmente, no porto de Suape estão instalados, ou em processo de instalação, mais de 70 empreendimentos, entre eles um estaleiro, uma refinaria de petróleo e um pólo petroquímico.

Todos esses empreendimentos são geradores de resíduos (principalmente HPAs e metais pesados) que podem impactar de maneira significativa o ambiente onde estão sendo lançados. Como são atividades concentradas em uma área estuarina, é natural esperar que seus resíduos sejam considerados poluidores potenciais de suas águas. Uma ferramenta importante na avaliação da qualidade da água e/ou do sedimento são os testes de toxicidade ambiental.

A toxicologia aquática estuda os efeitos de substâncias químicas e outros materiais, antropogênicos ou naturais, em organismos aquáticos (Nascimento *et al.*, 2002). O ouriço-do-mar é um dos animais marinhos mais utilizados como organismo-teste em bioensaios de poluição marinha (Cesar *et al.*, 2004; Pusceddu *et al.*, 2007). Estes efeitos nas diferentes fases de desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar podem servir como indicadores em bioensaios de toxicidade ambiental.

Os efeitos adversos de substâncias tóxicas incluem efeitos letais (agudos) em curto prazo e efeitos subletais (crônicos) em longo prazo, causando alterações na fertilização dos óvulos (Ghirardini *et al.*, 2005) e no desenvolvimento embrionário (Beiras *et al.*, 2003) e larval (Lorenzo *et al.*, 2002) de algumas espécies de ouriço-do-mar. Estas alterações são induzidas pelas águas contaminadas contendo, por exemplo, metais pesados (Kobayashi & Okamura, 2004); amônia (Siikavuopio *et al.*, 2004); sulfetos (Losso *et al.*, 2007) e HPAs (Steevens *et al.*, 1999).

Lytechinus variegatus Lamarck (1816) (Echinodermata: Echinoidea) é de grande importância ecológica devido a sua grande distribuição geográfica e abundância, tornando-o uma espécie potencialmente importante para bioensaios. *L. variegatus*

pertence à família *Toxopneustidae*, possui carapaça esverdeada e achatada inferiormente, e espinhos de cor variando desde verde até púrpura arroxeada. Alimenta-se de macroalgas, vive em locais onde estas são abundantes e possui o hábito de se recobrir com detritos vegetais, pequenas conchas etc. Esta espécie pode ser encontrada desde a zona entre marés até cerca de 20 m de profundidade. É bastante comum na região do Caribe e na costa Atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do Norte (EUA) até a costa sudeste do Brasil (ABNT, 2006; CETESB, 1999; Nascimento *et al.*, 2002). O desenvolvimento embriolarval desta espécie vem sendo utilizado como um modelo para avaliação de contaminantes fosfatados (Böttger & McClintock, 2001); HPAs (Steevens *et al.*, 1999) e metais (Kobayashi *et al.*, 2004) em sistemas marinhos.

Os testes com ouriços-do-mar foram padronizados pela U.S.EPA (1991-1994) e adaptado às espécies brasileiras (*L. variegatus* e *Echinometra Lucunter* LINNAEUS, 1758) pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (1999) e pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas - ABNT (2006). Estas Normas prescrevem o método para identificação da concentração de substâncias ou formulações químicas solúveis em água, de efluentes líquidos ou de água marinha superficial ou intersticial, que causam retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições estabelecidas de teste.

O teste é rápido, muito sensível e de elevada replicabilidade. O método padroniza testes de toxicidade crônica de curta duração, sobre o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Os testes toxicológicos com esta espécie permitem a análise toxicológica da água e da fase líquida extraída do sedimento (elutriato, água intersticial e interface sedimento-água).

Paralelamente aos ensaios toxicológicos, a ABNT (2006) e a U.S.EPA (1994), aconselham a checagem da sensibilidade dos organismos-teste utilizados nos ensaios (ovos de *L. variegatus* fertilizados “*in vitro*”). Tal checagem é realizada por meio de ensaios com uma substância química de referência. Tais ensaios têm como objetivo a confecção de uma carta-controle, que, por sua vez, tem o objetivo de representar graficamente a avaliação periódica dos resultados dos ensaios com a substância de referência.

Seguindo as Normas específicas mencionadas (ABNT, 2006; U.S.EPA, 1994), o presente estudo utilizou como substância de referência o dodecil sulfato de sódio – DSS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), substância amplamente utilizada nos processos de solubilização de proteínas, como desnaturante na eletroforese em gel de poliacrilamida, na indústria de

cosméticos e também como substância de referência em experimentos para a avaliação toxicológica com o ouriço-do-mar (CESAR *et al.*, 2002; CESAR *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se as águas superficiais do Complexo Estuarino de Suape – PE apresentam toxicidade devido à poluição ao meio ambiente, provocada pelas atividades agropecuárias, industriais e portuárias realizadas em seu entorno. Este trabalho também é parte integrante do Programa de Qualidade das Águas Superficiais e Sedimentos de Fundo da Área de Influência do Estaleiro Atlântico Sul (Contrato 207/07 FADE/ Instituto Monitore).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Utilizar o método padronizado de ensaio toxicológico, com o pluteus do ouriço-do-mar *L. variegatus*, de curta duração na avaliação toxicológica das águas superficiais do complexo estuarino de Suape – PE.

2.2. Específicos

Avaliar a sensibilidade da população de *L. variegatus*, da praia de Muro Alto – PE, ao DSS e iniciar a confecção de uma carta-controle onde constará a avaliação periódica dos resultados dos testes com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio – $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (DSS);

Incorporar a metodologia descrita nas Normas ABNT NBR 15350:2006 e CETESB L5. 250 – Maio/99, à rotina de bioensaios do Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia – LACE (Departamento de Oceanografia – CTG – UFPE);

Realizar ensaios toxicológicos com a água superficial de seis pontos distribuídos no complexo estuarino de Suape, localizados entre os estuários dos rios Tatuoca e Massangana, nos meses de maio, agosto, outubro e dezembro de 2007.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios toxicológicos foram realizados no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia – LACE, no Departamento de Oceanografia, localizado no Centro de Tecnologia e Geociências – CTG, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Os ensaios seguiram as Normas Técnicas mencionadas anteriormente (U.S.EPA, 1994; CETESB, 1999 e ABNT, 2006).

3.1. Área de Estudo

A área de estudo é o Complexo Estuarino de Suape (CES), onde se localiza a área interna do Complexo Porto-Industrial de Suape (8°23'30.56"S e 34°57'38.00"W) (Figura 1). As coletas foram realizadas bimestralmente nos meses de maio, agosto, outubro e dezembro de 2007. Preferencialmente, nas marés mais baixas de cada mês, em seis pontos distintos distribuídos entre os estuários dos rios Tatuoca e Massangana, localizados em torno da região de implantação do Estaleiro Atlântico Sul.

A baía de Suape e os estuários dos rios Massangana e Tatuoca são áreas submetidas a um regime polihalino/eurihalino, indicando uma grande influência de águas marinhas costeiras (Neumann *et al.*, 1998). As condições hidrológicas encontram-se dentro dos padrões normais para áreas costeiras com níveis relativamente baixos de poluição (FADE, 2006), permitindo, até o presente momento, que atividades turísticas e de pesca artesanal se desenvolvam na área de influência direta do Porto de Suape.

Os rios Massangana e Tatuoca, após o barramento dos aportes do rio Ipojuca, pelo advento da construção do Porto de Suape, apresentaram uma queda em seus níveis de produtividade primária. A principal fonte de fertilização do rio Massangana depende dos aportes de seus rios formadores (Tabatinga e Algoduais) e da matéria orgânica produzida em suas áreas de manguezal. O rio Tatuoca se origina a partir de descargas subsuperficiais. Ao se misturar com as águas marinhas, forma um manguezal que oferece boas condições de vida para uma série de organismos (FADE, 2006). A foz deste rio tem sofrido intervenções de dragagens frequentes na sua calha e aterros parciais ao longo de suas margens, incluindo trechos de manguezal. Tais fatos vêm contribuindo para a diminuição de sua fertilidade natural e contribuem, entre outras intervenções, para transformá-lo em apenas um canal de escoamento (FADE, 2006).

3.2. Coleta das Amostras

Em cada ponto de coleta foram recolhidas duas amostras de aproximadamente 300 mL da água superficial. A água foi coletada diretamente em garrafas plásticas de 500 mL, que eram identificadas e acondicionadas em caixas térmicas com gelo, para o transporte até o laboratório. A salinidade, a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido (O.D.) da água superficial foram aferidos, antes da coleta de cada amostra, por meio de um refratômetro de mão, um termômetro digital, um pHmetro de campo e um oxímetro de campo, respectivamente.

Também foram coletados dados pluviométricos da região. Estes dados foram obtidos e cedidos pelo Laboratório de Meteorologia de Pernambuco / Instituto de Tecnologia de Pernambuco – LAMEPE/ITEP, que possui uma estação de coleta de dados meteorológicos no município do Cabo de Santo Agostinho na Barragem de Suape.

Seguindo as recomendações das Normas ABNT NBR 15350:2006 e CETESB L5. 250 – Maio/99, em laboratório, as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer a -20°C , tendo assim, um prazo máximo de até 60 dias para serem analisadas. Entretanto todas as amostras foram analisadas em até 15 dias após a coleta.

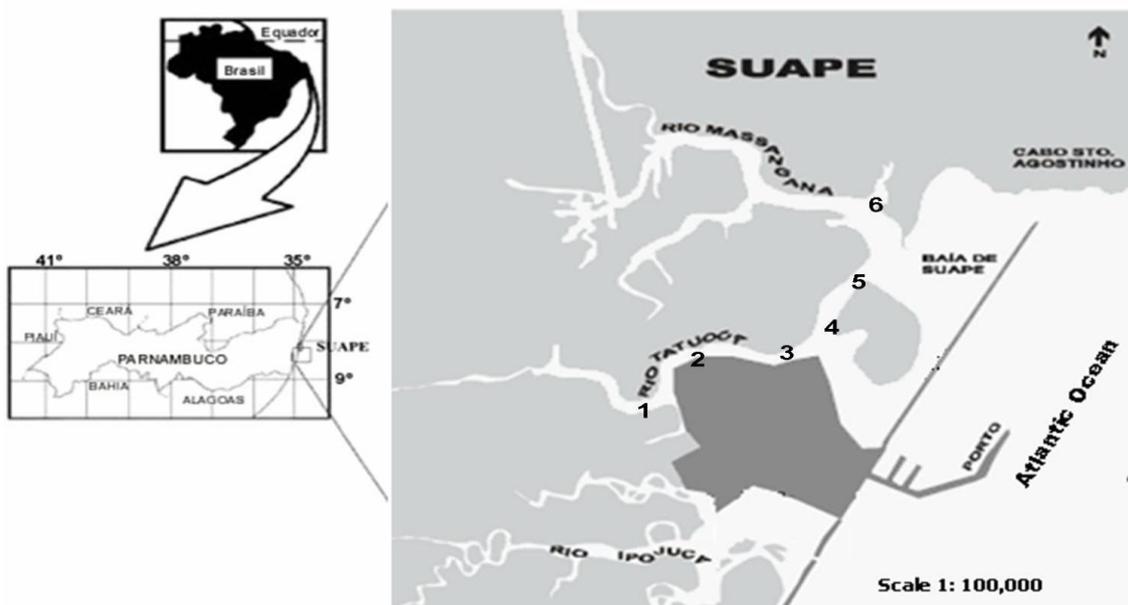


Figura 1. Área estudada e pontos de coleta. Estuários dos rios Tatuoca e Massangana. Adaptado de Koenig *et al.*, 2003.

3.3. Coleta dos Espécimes

De 20 a 30 exemplares de *L. variegatus* foram coletados uma semana antes da realização dos ensaios, logo ao sul da área de estudo, na praia de Muro Alto (8°25'28.06"S e 34°58'25.45"W), município de Ipojuca, litoral sul de Pernambuco, utilizando técnicas de mergulho livre a uma profundidade variando de 0,5 a 4 metros.

Os animais coletados foram acondicionados em caixas térmicas e levados ao laboratório onde foram mantidos em aquário com água do mar (previamente estabilizada) e alimentados com macroalgas da sua região de origem.

3.4. Água de Diluição Marinha

A água do mar utilizada nos controles e nos testes com a substância de referência foi doada pela Aqualider, empresa do ramo de produção de pós-larva do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* BOONE, 1931. Nesta empresa a água é coletada diretamente do mar e recebe tratamento especial para poder ser usada na larvicultura. Assim que é coletada, a água do mar passa por filtros de areia de diferentes granulações. Logo após, é irradiada com ultravioleta, clorada e desclorada.

No LACE, a água do mar tratada na Aqualider, foi acondicionada em caixas d'água e, antes do uso nos experimentos com DSS, foi filtrada por filtros tipo CUNO[®] de porosidade 25 e 3 µm. Suas características físico-químicas eram de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e salinidade 35 ± 2 , originalmente e posteriormente foram ajustadas para 25°C e 33 de salinidade para a realização dos experimentos.

3.5. Processo de Extração dos Gametas

Os ouriços-do-mar não apresentam dimorfismo sexual externo, sendo a sexagem feita pela coloração dos gametas. Os espécimes escolhidos para obtenção dos gametas foram lavados com água do mar para remoção de fezes e outros detritos aderidos ao corpo do animal.

O procedimento escolhido para extração dos gametas foi a injeção de 2,5 mL de KCl a 0,5 M, aplicada na região perioral do animal em dois pontos diretamente opostos. Após a aplicação do KCl os animais eram agitados suavemente, fazendo com que o KCl se espalhasse na cavidade celômica dos animais. Os gametas foram liberados pelos gonóporos, os quais estão localizados na superfície aboral do ouriço-do-mar.

Gametas femininos: os óvulos, identificados por sua cor amarelada, foram coletados diretamente na água do mar. Para tanto, cada fêmea foi apoiada sobre a

superfície de um *baecher* (com diâmetro menor que o do corpo do animal) cheio de água do mar filtrada, à temperatura e salinidade de manutenção dos organismos, com a superfície aboral voltada para baixo, de forma que os gonóporos permanecessem imersos na água. O KCl promove a liberação de todos os gametas (maturados e imaturos), de forma que nas fêmeas, os óvulos foram coletados por um período máximo de 15 minutos, evitando assim, que os óvulos imaturos fossem incluídos no experimento devido a uma desova prolongada.

Foi realizada a observação ao microscópio óptico de uma subamostra dos óvulos de cada fêmea antes de sua utilização. Os óvulos deviam apresentar-se arredondados, lisos e de tamanho homogêneo para poderem ser utilizados no experimento. Para facilitar o processo de fecundação, aguardou-se a decantação dos óvulos em cada *baecher*, e descartou-se o sobrenadante. Os óvulos, contidos no pequeno volume de água restante, foram peneirados através de malha de 300 μm , para retirada de fezes ou espinhos.

Em seguida, os mesmos foram reunidos em um *baecher* de 1000 mL e lavados duas vezes. Para tanto, foi acrescentado água do mar elevando-se o volume para 600 mL e aguardou-se nova decantação dos óvulos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e acrescentou-se água do mar filtrada e limpa. A solução foi homogeneizada por agitação suave e aguardou-se nova decantação. Este processo foi repetido por duas vezes.

Gametas masculinos: Os ouriços machos foram mantidos isolados em badejas plásticas secas para que o processo de separação dos gametas masculinos pudesse ser realizado. O esperma, identificado por sua cor branca, foi coletado com pipeta de Pasteur de ponta fina diretamente dos gonóporos, e mantido em *baecher* de 30 mL dentro de uma caixa térmica com gelo. Com isso, evitou-se que os espermatozoides entrassem em contato com a água do mar e, conseqüentemente, fossem ativados antes do início dos experimentos. O esperma de três machos (0,5 mL) foi diluído em 24,5 mL de água do mar filtrada para promover a ativação dos espermatozoides e chegar à concentração de aproximadamente 5×10^7 espermatozoides/mL. Os espermatozoides que se encontravam imóveis quando concentrados, após a suspensão em água do mar tornavam-se intensamente ativos. Essa solução foi preparada após o término da lavagem dos óvulos, e foi usada imediatamente após o preparo para o processo de fecundação.

Após a coleta dos gametas, os animais foram colocados em aquário marinho com aeração forte e, separados dos demais indivíduos que não foram utilizados no teste.

Esse procedimento foi necessário para a recuperação e diminuição da mortalidade dos ouriços-do-mar submetidos às injeções de KCl.

3.6. Processo de Fecundação

Para efetuar a fecundação em laboratório, foram acrescentados 2 mL da solução de esperma ao *baecher* contendo os óvulos (sob leve agitação manual) e aguardaram-se aproximadamente 10 minutos; tempo necessário para ocorrer a elevação da membrana de fecundação, que confirma a fecundação (Figura 2).

Foi coletado 1 mL da solução contendo os ovos fecundados. Este 1 mL foi diluído em 99 mL de água do mar, em proveta de 100 mL. Após forte agitação manual, foram tomadas três subamostras de 1 mL cada, para contagem em câmara de Sedgwick-Rafter. Este processo fornece a média do percentual de ovos fecundados da solução. É necessário um mínimo de 80% de ovos fecundados em cada subamostra (ABNT, 2006; CETESB, 1999).

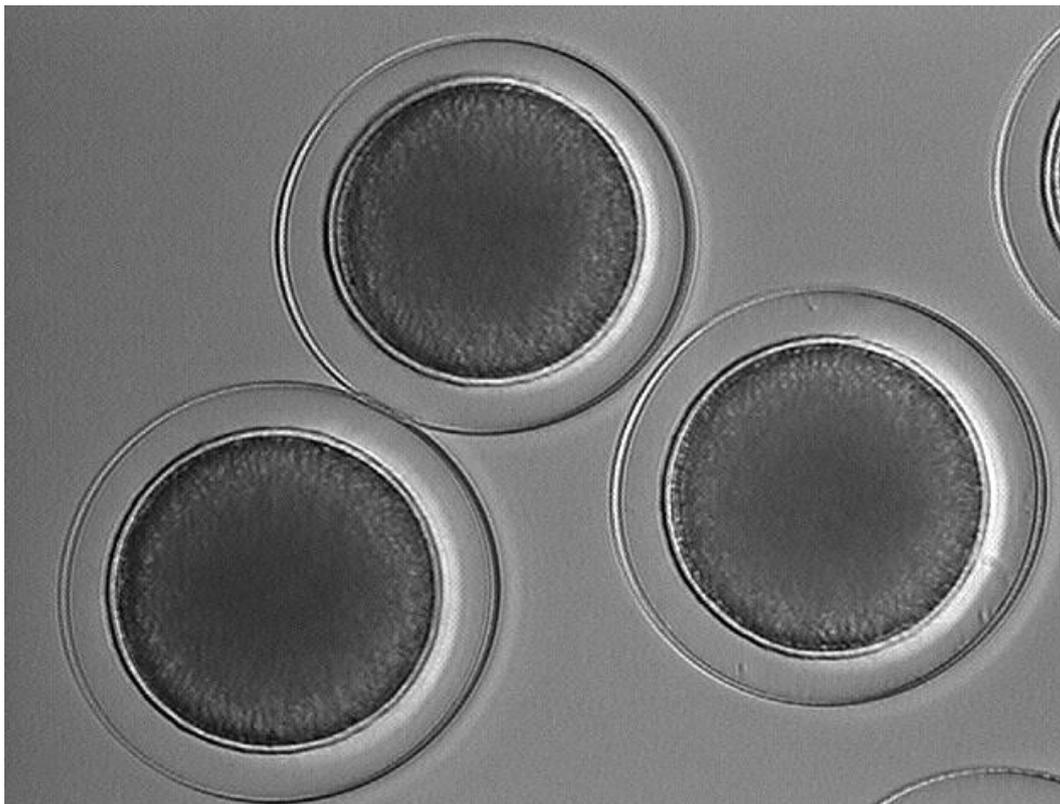


Figura 2. Ovos fertilizados, com destaque da membrana de fertilização (ABNT, 2006).

Após a contagem, foi feito o cálculo da média dos valores obtidos nas três subamostras. Esse valor foi multiplicado pelo fator de diluição (100), obtendo-se assim,

o número de ovos fecundados por mL da solução. Com estes dados foi calculado o volume da solução concentrada de ovos necessária para se obter 300 ovos fecundados que foram acrescentados a cada tubo teste com 10 mL da água a ser analisada. Este volume foi, em média, de 65 μ L.

3.7. Ensaios com a Substância de Referência (DSS)

No total, cinco ensaios foram realizados. O primeiro foi realizado isoladamente (ensaio preliminar), os quatro seguintes foram realizados em paralelo aos ensaios com as amostras de água superficial do complexo estuarino de Suape. Nestes testes foram utilizados um controle (água do mar filtrada sem DSS) e 6 concentrações de DSS diluídos em água do mar filtrada (0,125; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 mg/L), cada uma com 4 réplicas, obtidas a partir de uma solução estoque de DSS de 1000 mg/L a 33 de salinidade.

3.8. Ensaios com a Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape (CES)

Antes da análise, as amostras foram descongeladas em ambiente fresco, arejado e protegido dos raios e calor direto do sol. Das duas amostras armazenadas, de cada ponto de coleta, apenas uma foi descongelada, a outra permaneceu congelada para o caso de uma eventual necessidade de repetição da análise. Após o prazo máximo de 60 dias, tais amostras eram descartadas.

As amostras estavam prontas para a análise ao atingirem uma temperatura em torno de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Antes da análise, foram aferidos novamente os valores da salinidade, da temperatura, do pH e do oxigênio dissolvido. Para atingir os valores exigidos pelas Normas, quando necessário, os valores da salinidade foram ajustados com salmoura (preparada a partir do congelamento de uma amostra de água do mar filtrada) ou com adição de água destilada (ABNT, 2006; CETESB, 1999).

Das amostras de cada ponto foram retiradas quatro subamostras de volume de 10 mL cada. Esse volume foi colocado em tubos de ensaio de vidro de 40 mL, juntamente com cerca de 300 ovos fertilizados de *L. variegatus*.

3.9. Incubação, Encerramento e Leitura do Teste

Os tubos foram acondicionados em uma estante porta-tubo e levados para uma estufa-incubadora a uma temperatura controlada de 25°C , por 28 horas. O teste foi encerrado após 28 horas, quando pelo menos 80% dos organismos no controle atingiram

o estágio de pluteus bem desenvolvido, com braços de comprimento, no mínimo, igual ao comprimento do corpo da larva, sendo considerados indivíduos formados (Figura 3). Isto foi verificado através da identificação do estágio de desenvolvimento dos 100 primeiros organismos de uma das réplicas do controle. Passado esse tempo o conteúdo foi fixado com formol tamponado com Bórax.

Para a leitura do teste, foi tomada uma alíquota de aproximadamente 1 mL de cada tubo de ensaio e analisada em câmara de Sedgwick-Rafter. O estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos em cada réplica foram observados.

Primeiramente foi observado o controle, pois este deve ser utilizado como referência para leitura das soluções-teste, de maneira aleatória. Foram considerados anormais os estágios anteriores à larva pluteus, os pluteus com atraso no desenvolvimento em relação ao controle e os organismos deformados. Estas anormalidades são consideradas como efeito, devendo-se somar, em cada solução-teste, o total destes organismos, sendo estes considerados indivíduos não formados.

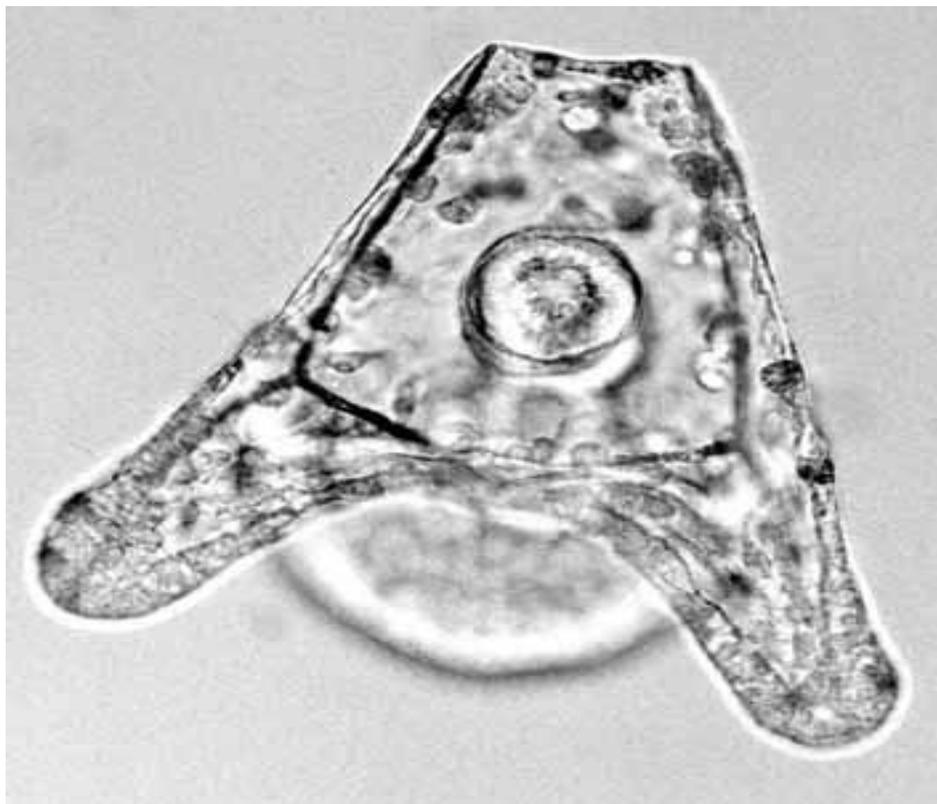


Figura 3. Pluteus recém formado no momento do encerramento do teste (CETESB, 1999).

3.10. Análise dos Dados

Com os dados do percentual de pluteus de *Lytechinus variegatus* não formados, foi possível calcular a concentração efetiva do DSS que causa anomalias e/ou retardo ao desenvolvimento embriolarval a 50% dos organismos-teste (CE₅₀), através do programa de análise EPA PROBIT versão 1.5.

A comparação do percentual de pluteus formados entre os pontos de coleta foi feita através da ANOVA ($\alpha = 0,05$), depois da verificação da normalidade dos dados (Teste de Kolmogorov-Smirnov; $\alpha = 0,05$) e da homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett; $\alpha = 0,05$). Quando identificadas diferenças significativas, foi utilizado o teste de Tukey *a posteriori*. Para os dados que não se apresentaram normais ou homoscedásticos, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi realizado no lugar da ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros Físico-Químicos da Água e Pluviometria do CES

Os parâmetros salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água do CES foram aferidos em campo e em laboratório (antes e após os ensaios toxicológicos). Estes mesmos parâmetros também foram aferidos na água do mar que foi utilizada no grupo controle e nos ensaios com a substância de referência (Tabelas 1 e 2). Os resultados encontrados estavam dentro dos padrões exigidos pelas Normas consultadas.

Os índices pluviométricos obtidos e cedidos pelo LAMEPE / ITEP mostraram-se próximos à média histórica para a região (Figura 4).

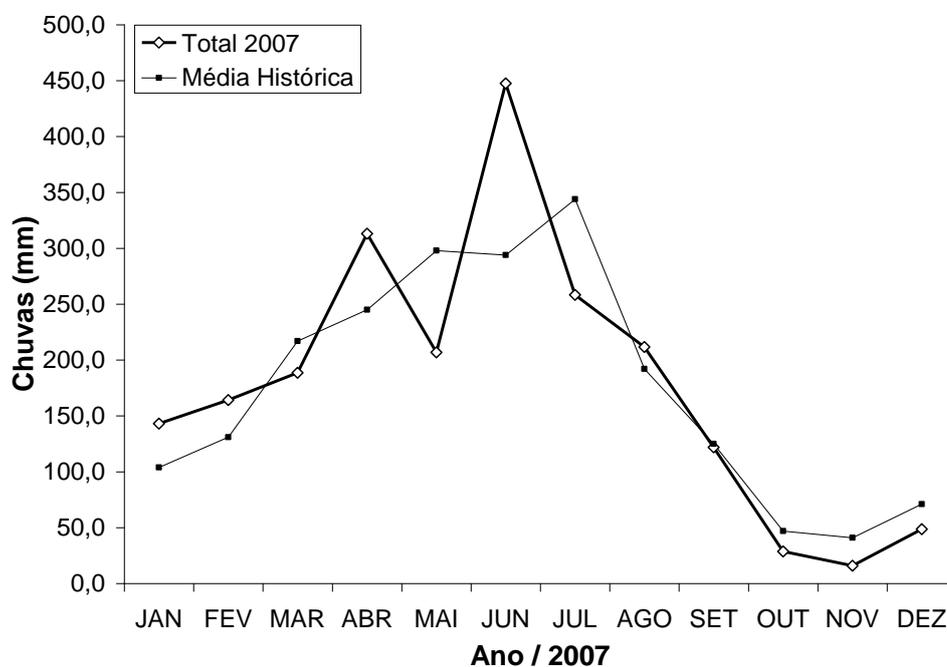


Figura 4. Total de chuvas (mm) observadas no período de janeiro a dezembro de 2007 e média histórica para região do município do Cabo de Santo Agostinho, estação meteorológica da Barragem de Suape (LAMEPE / ITEP, 2008).

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas da água superficial no Complexo Estuarino de Suape entre maio e dezembro de 2007.

Data	BM	PM	Ponto	Hora	T° C	pH	SAL.	O.D. (mg/L)
22.Mai.2007	01:51 - 0,8m	08:00 - 1,8m	1	09:30	27,7	8,0	31	4,4
			2	09:56	27,9	8,0	34	5,9
			3	10:18	27,4	7,9	28	5,7
			4	10:33	27,7	8,1	28	5,5
			5	10:42	27,5	7,9	28	5,1
			6	10:55	27,5	7,9	31	5,3
08.Ago.2007	06:02 - 0,6m	12:23 - 1,8m	1	09:35	26,3	8,0	31	4,8
			2	09:55	27,8	8,1	33	5,7
			3	10:15	26,9	8,2	35	5,1
			4	10:28	27,6	8,4	27	5,3
			5	10:38	27,7	8,4	27	4,9
			6	10:55	27,6	8,6	31	5,9
23.Out.2007	08:00 - 0,4m	14:02 - 2,1m	1	09:40	28,0	7,9	31	4,1
			2	10:18	28,0	7,9	31	4,6
			3	10:31	28,2	7,9	32	3,8
			4	10:58	28,6	7,9	31	3,5
			5	11:12	28,8	7,9	32	4,5
			6	11:40	28,6	7,9	33	4,2
11.Dez.2007	10:34 - 0,5m	16:08 - 2,1m	1	10:00	29,2	7,7	40	3,5
			2	10:25	29,0	7,7	40	3,5
			3	10:35	29,1	7,8	39	3,6
			4	10:50	29,3	7,8	39	3,8
			5	11:00	30,2	7,8	40	3,9
			6	11:30	29,2	7,6	39	3,2

Obs.: BM = Baixa-mar; PM = Preamar; O.D. = Oxigênio dissolvido; SAL. = Salinidade e T°C = Temperatura em °C.

4.2. Ensaios de Toxicidade

O presente estudo realizou cinco ensaios válidos, número mínimo necessário de ensaios para se iniciar a confecção de uma carta-controle, atendendo as exigências das Normas ABNT NBR 15350:2006 e CETESB L5. 250 – Maio/99. O primeiro deles foi realizado apenas com a substância de referência DSS. Os demais foram realizados com amostras da água superficial do Complexo Estuarino de Suape, em paralelo com os bioensaios com DSS. Nestes ensaios considerados válidos, o percentual de larva pluteus formada, no controle, foi superior a 80% e os resultados das análises físico-químicas da água encontravam-se dentro dos limites aceitáveis para a espécie utilizada (CETESB, 1999; ABNT, 2006) (Tabelas 2).

4.2.1. Ensaios com a Substância de Referência (DSS)

O controle apresentou uma média superior a 80% ($84,59 \pm 1,644\%$) de pluteus de *L. variegatus* formados. Pode-se observar que a porcentagem de pluteus não formado aumenta com a concentração de DSS nos cinco ensaios de forma semelhante (Figura 5).

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas da água do CES, do controle e da substância de referência nos bioensaios com *L. variegatus*.

Pontos	T°C	SAL.(‰)	pH	O.D.(mg/L)	T°C	SAL.(‰)	pH	O.D.(mg/L)	T°C	SAL.(‰)	pH	O.D.(mg/L)	T°C	SAL.(‰)	pH	O.D.(mg/L)
INICIAIS LAB.																
		Maio	2007			Agosto	2007			Outubro	2007			Dezembro	2007	
Controle	25,0	32	8,1	6,4	25,0	34	8,0	4,7	25	34	8,0	4,9	25	35	8,0	6,4
DSS 0,125 mg/L	25,0	32	8,1	6,1	25,0	32	7,9	6,1	25	36	8,0	5,6	25	35	8,2	6,4
DSS 0,250 mg/L	25,0	32	8,0	6,0	25,0	33	8,0	6,2	25	35	7,9	6,3	25	35	8,1	6,3
DSS 0,5 mg/L	25,0	32	8,1	5,9	25,0	33	8,0	6,4	25	35	8,1	6,1	25	35	8,1	6,4
DSS 1,0 mg/L	25,0	32	8,1	6,0	25,0	33	8,0	6,4	25	36	8,1	5,9	25	35	8,1	6,6
DSS 2,0 mg/L	25,0	32	8,0	6,2	25,0	33	8,0	6,3	25	35	8,1	5,6	25	35	8,1	6,3
DSS 4,0 mg/L	25,0	32	8,0	6,1	25,0	33	8,0	6,5	25	35	8,1	5,7	25	35	8,1	6,5
P1	26,5	31	8,3	5,6	25,0	31	7,9	6,5	25	31	8,0	5,9	25	35	8,1	6,3
P2	26,4	34	8,2	5,4	25,0	33	8,0	5,7	25	31	7,8	5,5	25	34	8,1	6,3
P3	26,7	32	8,3	5,1	25,0	35	8,1	6,1	25	32	8,2	5,8	25	34	8,1	6,4
P4	26,4	32	8,4	5,3	25,0	33	8,1	6,0	25	31	8,3	5,4	25	34	8,1	6,1
P5	26,3	32	8,2	5,6	25,0	33	8,1	6,1	25	32	7,9	5,9	25	34	8,1	5,8
P6	27,0	31	8,1	5,5	25,0	31	8,0	6,5	25	33	7,8	6,0	25	33	7,9	6,2
FINAIS LAB.																
		Maio	2007			Agosto	2007			Outubro	2007			Dezembro	2007	
Controle	25	33	8,1	6,4	25,0	33	7,8	5,8	25	34	8,0	4,1	25	34	7,9	6,1
DSS 0,125 mg/L	25	33	8,0	6,1	25,0	34	7,8	6,2	25	33	7,9	4,7	25	35	8,0	6,1
DSS 0,250 mg/L	25	32	8,1	6,0	25,0	33	7,8	6,0	25	34	7,8	4,8	25	35	8,0	6,0
DSS 0,5 mg/L	25	34	8,1	5,9	25,0	35	7,8	5,9	25	34	7,8	4,4	25	35	8,0	6,2
DSS 1,0 mg/L	25	33	8,1	6,0	25,0	34	7,8	5,8	25	35	7,9	4,2	25	36	8,0	5,8
DSS 2,0 mg/L	25	34	8,0	6,2	25,0	33	7,8	5,8	25	35	7,8	4,8	25	35	8,2	6,3
DSS 4,0 mg/L	25	33	8,1	6,1	25,0	33	7,8	5,8	25	34	7,8	4,8	25	34	8,0	6,2
P1	25	37	8,1	5,6	25,0	31	7,8	6,0	25	34	8,0	4,7	25	34	8,1	6,3
P2	25	35	8,1	5,4	25,0	32	7,9	6,3	25	33	8,0	4,8	25	35	7,9	6,2
P3	25	35	8,1	5,1	25,0	32	7,9	6,0	25	34	8,0	4,9	25	35	8,1	6,5
P4	25	38	8,0	5,3	25,0	32	7,4	6,2	25	33	8,0	4,7	25	35	8,0	6,4
P5	25	36	8,0	5,6	25,0	32	7,5	5,9	25	34	8,0	4,6	25	34	8,0	6,7
P6	25	40	8,1	5,5	25,0	32	7,5	5,9	25	33	8,0	4,3	25	32	8,0	6,7

Obs.: O.D. = Oxigênio dissolvido; SAL. = Salinidade; T°C = Temperatura em °C e LAB. = Laboratório.

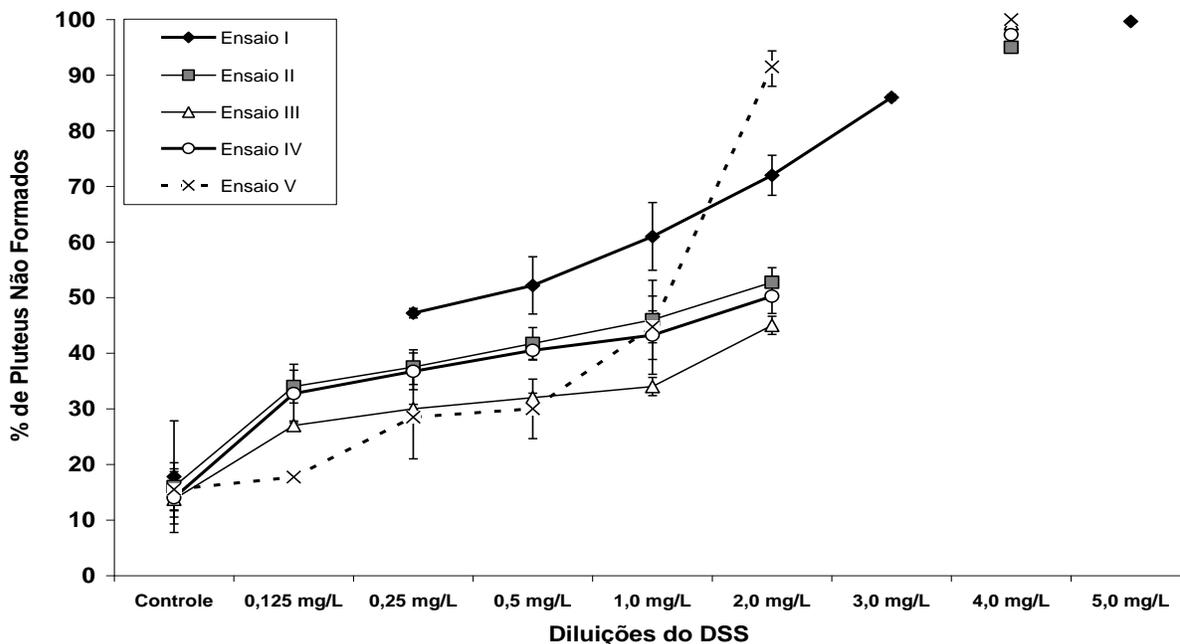


Figura 5. Média (\pm desvio padrão) do percentual de pluteus não formados de *L. variegatus* em função da concentração de Dodecil Sulfato de Sódio - $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (DSS) em cada um dos 5 bioensaios realizados. Ensaio I = Ensaio Preliminar; Ensaio II = Maio/2007; Ensaio III = Agosto/2007; Ensaio IV = Outubro/2007 e Ensaio V = Dezembro/2007.

Os indivíduos coletados da população de *L. variegatus* na praia de Muro Alto apresentaram uma CE_{50} de $1,83 \pm 0,798$ mg/L de DSS (Figura 6). Este valor representa a média provisória e apresentou um coeficiente de variação de 43,61%.

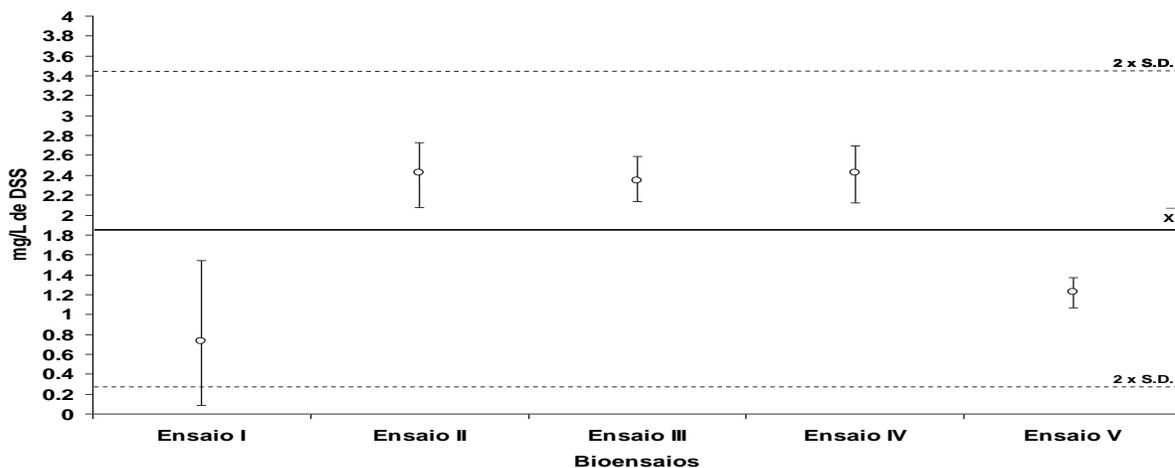


Figura 6. Valores (\pm desvio padrão) da CE_{50} em mg/L do Dodecil Sulfato de Sódio - $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (DSS) após 28 horas em cada um dos 5 bioensaios com *L. variegatus* coletados em Muro Alto – PE, Brasil.

4.2.2. Ensaios com a Água Superficial do Complexo Estuarino de Suape (CES)

Todos os ensaios com a água superficial do complexo estuarino de Suape tiveram a duração de 28 horas. Os dados do percentual de pluteus formados, nas quatro análises realizadas,

mostraram-se normais (*K-S Test* – $p > 0,05$), porém apenas os dados da análise do mês de outubro de 2007 mostraram-se homoscedásticos (Teste de Bartlett – $p > 0,05$). Sendo assim, apenas os dados da análise de outubro de 2007 foram tratados com a ANOVA. Os dados dos demais meses foram tratados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No mês de maio de 2007, o percentual de pluteus formados variou significativamente entre os pontos ($K-W = 15,333$; $p = 0,017$). O teste de Tukey identificou que apenas o ponto 6 foi diferente dos demais, sendo o único a apresentar sinais de toxicidade (Figura 7).

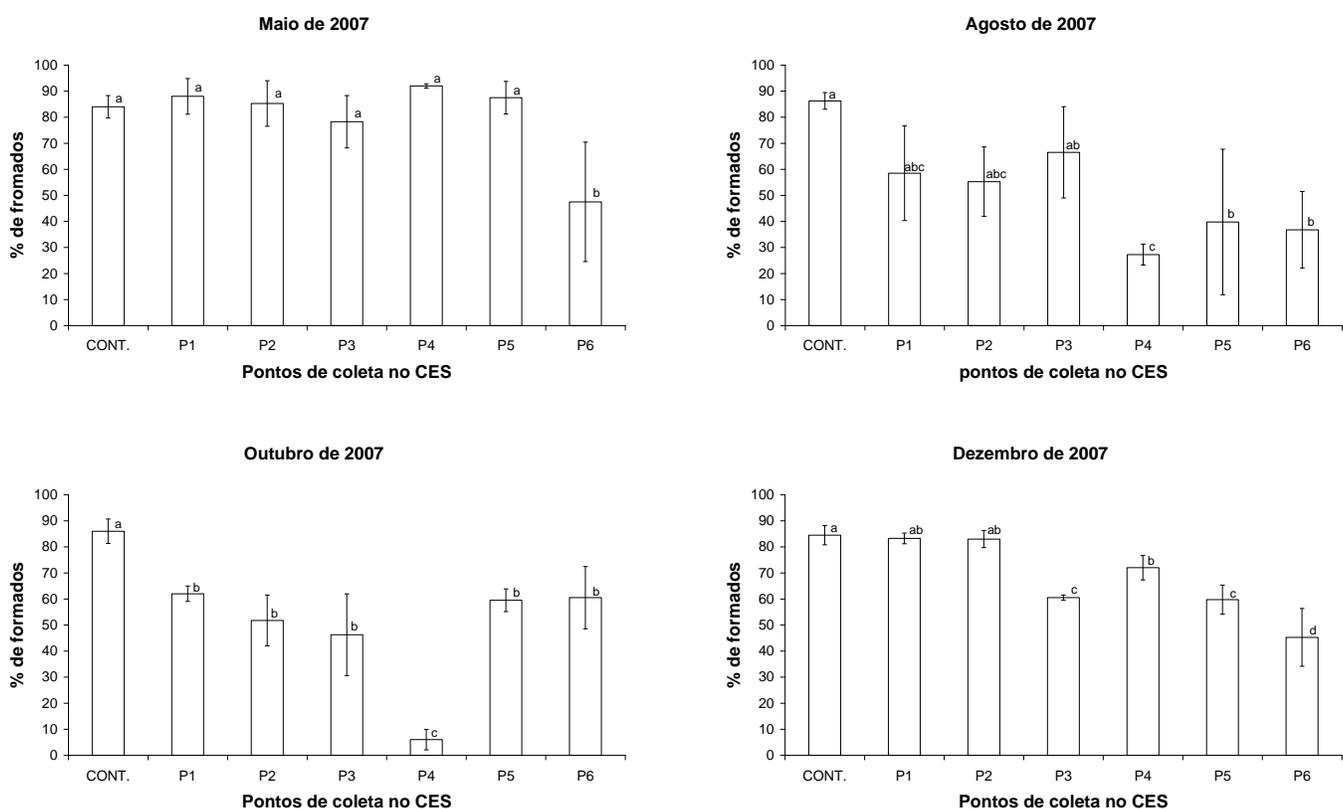


Figura 7. Média (\pm desvio padrão) do percentual de pluteus formados de *L. variegatus* no controle e nos pontos de coleta em cada um dos meses de ensaios. As letras a, b e c mostram as diferenças significativas ($p < 0.05$) no teste de Tukey.

No mês de agosto de 2007, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis evidenciou diferenças significativas entre os pontos ($K-W = 17,459$; $p = 0,007$). O teste de Tukey indicou que os pontos 1, 2 e 3, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Os

pontos estatisticamente diferentes do controle foram os pontos 4, 5 e 6, sendo o ponto 4 o que apresentou menor percentual de pluteus de *L. variegatus* formados (Figura 7).

No mês de outubro de 2007, o percentual de pluteus formados variou significativamente entre os pontos ($F = 29,950$; $p < 0,00001$). O teste de Tukey indicou que todos os pontos foram diferentes do controle, apresentando toxicidade. Novamente o ponto 4 foi o que apresentou menor porcentagem de pluteus de *L. variegatus* formados. Os pontos 1, 2, 3, 5 e 6, não foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 7).

Na análise do mês de dezembro de 2007, o percentual de pluteus formados variou significativamente entre os pontos ($F = 31,039$; $p < 0,00001$). O teste de Tukey evidenciou que os pontos 1 e 2 foram os únicos que não apresentaram toxicidade, não sendo significativamente diferentes do controle. Os demais pontos foram estatisticamente diferentes do controle. Nesta análise, o ponto 6, seguido do ponto 3, foram os que apresentaram menor percentual de pluteus de *L. variegatus* formados (Figura 7).

A toxicidade nos pontos de coleta variou para cada mês analisado (Figura 8). O ponto 6 apresentou toxicidade em todos os meses analisados, ficando sua média de pluteus formados em $47,5 \pm 16,7\%$. O mês de outubro apresentou a pior situação com toxicidade em toda área estudada.

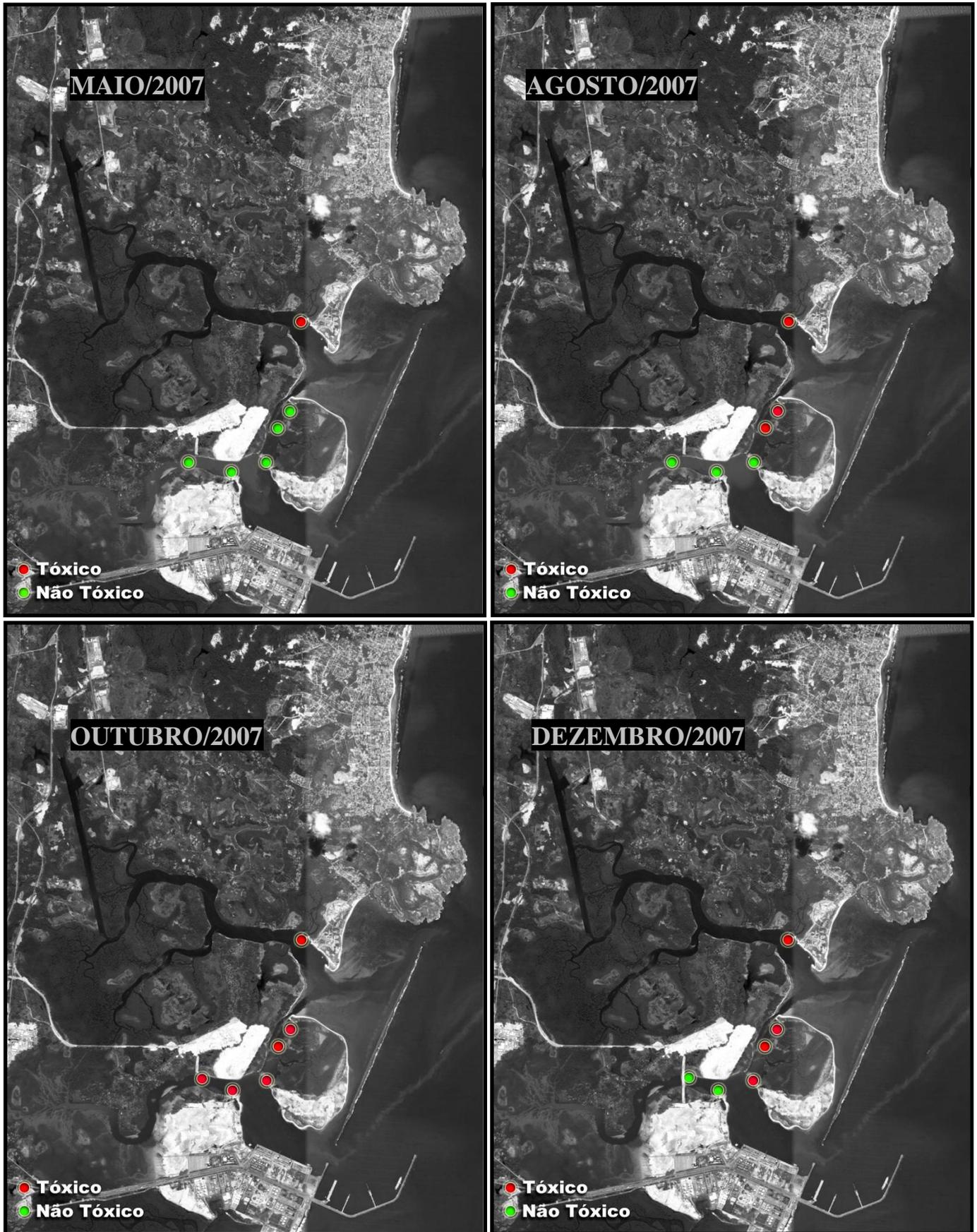


Figura 8. Imagem aérea da região mostrando a variação da toxicidade no mês de maio; agosto; outubro e dezembro de 2007. Pontos vermelhos = Tóxico; Pontos verdes = Não Tóxico.

5. DISCUSSÃO

Os organismos-teste foram submetidos a testes com a substância de referência onde sua condição de sensibilidade e/ou resistência foi avaliada. Estes testes são especialmente importantes quando os organismos-teste utilizados são obtidos em campo, pois suas condições de resistência têm que ser avaliadas antes do início dos testes. Os testes com a substância de referência DSS, no presente estudo, apresentou uma CE_{50} média ($n = 5$) de $1,83 \pm 0,798$ mg/L. Esta média é considerada provisória, pois segundo a ABNT (2006) e a U.S.EPA (1994), na impossibilidade de se calcular uma média com os valores de vinte testes com a substância de referência, pode-se calcular uma média provisória com os resultados de cinco testes. Os resultados da CE_{50} dos cinco ensaios realizados no presente estudo encontraram-se dentro dos limites de controle (± 2 desvio padrão), sendo considerados válidos para composição da carta-controle (ABNT, 2006; U.S.EPA, 1994). No entanto o coeficiente de variação foi alto.

Segundo Abessa & Sousa (2003), estudando a sensibilidade do Amphipoda *Tiburonella viscana* ao dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e seguindo recomendações da *Environment Canada*, o valor máximo aceitável do coeficiente de variação (CV) é de 30%. Provavelmente, no decorrer da realização de mais testes de referência para confecção de uma carta-controle com $n = 20$, essa variação diminuirá, chegando a valores com menor variação.

Cesar *et al.* (2002), seguindo recomendações da U.S.EPA, *Environment Canada* e CETESB (1999), utilizando o DSS como substância de referência, encontrou resultados mais precisos com $n = 6$. Este autor, utilizando as espécies de ouriços-do-mar *Arbacia lixula* Linnaeus, 1758; *Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816 e *Sphaerechinus granularis* Lamarck, 1816, obteve um CV para estas três espécies de 3,33% ($n = 6$); 6,79% ($n = 6$) e 1,78% ($n = 5$), respectivamente. Estes dados demonstram que a população de *L. variegatus* da praia de Muro Alto – PE apresenta uma grande variação em sua sensibilidade ao DSS quando comparada com estas espécies.

Cesar *et al.* (2002) ainda calculou o CI_{50} (Concentração de Inibição a 50% da população) de DSS para as três espécies estudadas: $1,56 \pm 0,06$ mg/L (*A. lixula*); $1,49 \pm 0,04$ mg/L (*P. lividus*) e $1,65 \pm 0,04$ mg/L (*S. granularis*) de DSS. Estes dados estão mais próximos aos encontrados no presente trabalho ($1,83 \pm 0,798$ mg/L). Ainda assim, quando observado a CE_{50} média \pm desvio padrão, percebe-se uma maior variação nos dados obtidos para *L. variegatus*, no presente estudo. Em Cesar *et al.* (2004), utilizando as mesmas espécies citadas anteriormente (*A.*

lixula, *P. lividus* e *S. granularis*), a CI_{50} manteve a mesma média ($1,55 \pm 0,17$ mg/L; $1,48 \pm 0,34$ mg/L e de $1,59 \pm 0,22$ mg/L, respectivamente). Desta forma, observa-se que a sensibilidade ao DSS que *L. variegatus* apresenta pode ser considerada semelhante à encontrada nestas espécies.

Estudando a toxicidade de compostos orgânicos para o desenvolvimento de embriões e o comprimento larval de invertebrados marinhos, Bellas *et al.* (2005), encontrou para o ouriço-do-mar *P. lividus*, uma CE_{50} – 48 horas de 4,277 mg/L de DSS. Quando comparado a estes resultados, *L. variegatus* possui uma sensibilidade maior ao DSS do que *P. lividus*. Bellas *et al.* (2005), ainda cita outros valores de CE_{50} de DSS para *P. lividus* (4,157 mg/L – 24 horas); *L. variegatus* (2,7 mg/L – 24 horas) e *Echinometra lucunter* (3 mg/L – 36 horas).

Os ensaios com a substância de referência DSS mostraram que a população de *L. variegatus* coletada na praia de Muro Alto – PE, apesar de algumas variações na sua sensibilidade, encontrava-se em boas condições para ser utilizada nos ensaios toxicológicos para a avaliação da água superficial do complexo estuarino de Suape.

Sendo assim, a primeira análise foi realizada no mês de maio de 2007. Esta análise indicou que apenas a estação de coleta do estuário do rio Massangana (ponto 6) apresentava toxicidade na água. Neste ponto, em laboratório (Tabela 2), o valor da salinidade, ao final do experimento, encontrou-se em 40, valor superior ao recomendado pelas Normas consultadas. Porém, este fato, pode não ter contribuído para o baixo percentual de formação de pluteus, pois o ponto 4 e o ponto 1, no mesmo mês, apresentaram salinidades de 38 e 37, respectivamente e, o percentual de formação de pluteus nestes pontos, não foram estatisticamente diferentes do controle.

No mês de maio de 2007, as coletas foram realizadas na maré vazante entre as 09:30 e 10:55 horas da manhã (preamar 08:00 – 1,8 m; Tabela 1). Nestes horários a altura da maré estava entre 1,56 – 1,32 m, aproximadamente. Este fato pode ter contribuído para a baixa incidência de pontos evidenciando toxicidade, pois a renovação da água local pelo aporte das águas trazidas pela maré alta pode ter diluído os possíveis poluentes existentes nas águas carreadas pelos rios Tatuoca e Massangana até o local das estações de coleta.

A maré alta também poderia trazer poluentes originários da área interna do porto de Suape, pois um dos principais acessos das águas oceânicas para a parte interna do porto é o canal de navegação, que tem comunicação direta com o Oceano Atlântico.

Historicamente, o mês de maio está inserido no período de maior precipitação para a região (Neumann *et al.*, 1998; FADE, 2006 e LAMEPE/ITEP, 2008). Segundo LAMEPE/ITEP (2008), os maiores índices de precipitação para a região estudada, no ano de 2007, ocorreram entre os meses de março e agosto, e os menores índices entre os meses de setembro e fevereiro.

As aferições de salinidade em campo em maio de 2007 mostraram que os pontos 1, 2 e 6 indicavam maior predominância de águas marinhas com salinidades entre 31 e 34, enquanto os demais pontos apresentavam salinidades igual a 28 (Tabela 1), indicando maior influência de água doce nos pontos 3, 4 e 5.

No presente estudo, independente do índice de precipitação (estação seca ou chuvosa), o ponto de coleta do estuário do rio Massangana (ponto 6) sempre indicou toxicidade para a água superficial. No riacho Algoduais, afluente do rio Massangana, Mendonça (2005) usando como organismos-teste a fotobactéria *Vibrio fischeri* e o microcrustáceo *Daphnia magna*, detectou toxicidade nos efluentes de três empresas dos setores de bebida, metalurgia e têxtil. No riacho, também foram detectados valores de toxicidade a jusante das três empresas.

A coleta para a segunda análise foi realizada em agosto de 2007, final do período chuvoso. As coletas foram realizadas na maré enchente entre as 09:35 e 10:55 horas da manhã (preamar 12:23 – 1,8 m; Tabela 1). Nestes horários a altura da maré estava entre 1,3 – 1,6 m, aproximadamente. O percentual de pluteus formados nos pontos caiu, de forma que, além do ponto 6, os pontos 4 e 5 passaram a apresentar toxicidade. No mês de agosto, nos pontos 1, 2, 3 e 6, as salinidades encontradas variaram entre 31 e 35, nos pontos 4 e 5 a salinidade foi igual a 27 (Tabela 1), indicando maior influência de água doce nestes pontos.

Segundo dados mencionados pela FADE (2006), uma elevada salinidade (34,8) apresenta-se, principalmente, na baía de Suape e, no seu trecho inferior, nos estuários dos rios Tatuoca e Massangana, com valores variando, entre os períodos chuvosos e de estiagem, entre 27 e 37,5. As menores salinidades foram observadas na camada superficial das águas da foz do estuário do rio Tatuoca no período chuvoso, na baixa-mar, quando é maior a influência da descarga do rio Tatuoca e menor a influência das marés na baía de Suape.

A FADE (2006) também evidencia que a vazão do rio Tatuoca é inferior à vazão do rio Massangana. Estes dados apontam um provável padrão de circulação das águas na baía de Suape, no sentido Norte – Sul. Tal fato geraria maior influência do aporte de água do rio Massangana sobre o aporte de água do rio Tatuoca, já que as águas do rio Massangana são deslocadas no

sentido sul pela força da água marinha que entra na baía de Suape pela abertura norte nos arrecifes de arenito.

Desta forma, reúnem-se evidências para sugerir que a toxicidade encontrada nos pontos de coleta 4, 5 e 6, no mês de agosto de 2007, pode ter sido causada por um possível aporte de poluição advindo do rio Massangana que ganhou intensidade com as chuvas do período.

Nilin *et al.* (2007), avaliando a qualidade das águas do estuário do rio Ceará, usando o teste de toxicidade embriolarval do ouriço-do-mar *L. variegatus*, relaciona a maior toxicidade encontrada, na maior parte das suas estações de coleta, à proximidade da confluência entre o rio Ceará e o rio Maranguapinho, que recebe efluentes do distrito industrial de Maracanaú. Das quatro estações de coleta analisadas em seu estudo, duas delas (as mais próximas ao rio Maranguapinho) apresentaram toxicidade durante todo o período chuvoso, outra, um pouco mais distante, apresentou toxicidade em apenas dois meses deste período.

A análise realizada no mês de outubro de 2007, já então no início do período de estiagem, apresentou os piores resultados para o percentual de pluteus formados. Neste mês, todos os pontos passaram a apresentar toxicidade, sendo o ponto 4 o pior de todos. As coletas foram realizadas na maré enchente entre as 09:40 e 11:40 horas da manhã (baixa mar 08:00 – 0,4 m; Tabela 1). Nestes horários a altura da maré estava entre 0,9 – 1,44 m, aproximadamente. As estações de coleta apresentaram águas com salinidades variando entre 31 e 33, provavelmente por se tratar de um mês que caracteriza a estação de estiagem e por causa da maré enchente, fazendo com que as águas marinhas tivessem maior influência sobre as águas fluviais naquele momento.

Ainda no mês de outubro, observou-se o início da construção de uma via que cortava o rio Tatuoca na altura entre o ponto 1 e o ponto 2, o que não permitiu que o barco utilizado para as coletas alcançasse o ponto 1. Desta forma, a posição do ponto 1 foi transferida para um local a jusante da obra, onde o barco pudesse navegar sem risco de encalhamento, ficando mais próxima do ponto 2.

Levando em consideração que as águas do rio Massangana possuem uma vazão mais forte em relação às do rio Tatuoca, e que o mês de outubro caracteriza o período de estiagem, pode se considerar que os possíveis poluentes existentes nas águas do rio Massangana conseguiram contaminar as águas dos pontos 5, 4 e, provavelmente, 3. Possivelmente, poluentes existentes nas áreas adjacentes ao canal de navegação e à parte interna do porto de Suape, podem ter contribuído com a contaminação das águas dos pontos de coleta do rio Tatuoca (pontos 1, 2 e

3). Com uma menor quantidade de chuvas no mês de outubro e somando-se a uma maré enchente, as águas do rio Massangana e as águas das áreas adjacentes ao porto interno de Suape, respectivamente, conseguiram maior influência sobre as águas do rio Tatuoca.

Araújo-Castro *et al.* (2006), investigando a toxicidade do sedimento integral (fase sólida) da baía de Suape usando o Copepoda Harpacticoida *Tisbe biminiensis* como organismo-teste, não evidenciou toxicidade letal, nem subletal, em um ponto localizado em frente à área interna do porto de Suape (no canal de navegação). Contudo, na foz do estuário do rio Massangana, no período seco (fevereiro), foi evidenciado toxicidade letal para *T. biminiensis*. No mesmo ponto, no período chuvoso (junho), o nível de toxicidade encontrado provocou efeito subletal para *T. biminiensis*. No mesmo estudo, tanto no período seco como no período chuvoso, não foi evidenciada toxicidade para *T. biminiensis*, em um ponto de coleta localizado no estuário do rio Tatuoca. Estes resultados indicaram uma diferença na disponibilidade de contaminantes entre as estações seca e chuvosa, apontando as águas do rio Massangana como a principal carreadora dos possíveis poluentes que influenciam a área. Também indicaram que o porto interno de Suape, em 2003, não parecia ser responsável pela toxicidade encontrada na área, o que corrobora as conclusões do presente estudo.

Segundo FADE (2006) os estuários do rio Tatuoca e Massangana apresentam condições hidrológicas dentro dos padrões normais para áreas costeiras com baixos níveis de poluição, evidenciando que estas áreas, sob a influência direta do porto de Suape, não sofrem prejuízo detectável até o momento proveniente de efluentes líquidos resultantes das atividades portuárias ou industriais.

Um dos pontos avaliados pela FADE (2006) foram os níveis de amônia não ionizada nas águas dos estuários dos rios Tatuoca e Massangana. Tais níveis variaram de <0,001mg/L na preamar, até 0,007mg/L na baixa-mar. Segundo as Normas Técnicas consultadas, uma concentração de 0,05 mg/L de amônia não ionizada, isoladamente, já pode causar efeitos tóxicos ao desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *L. variegatus*. Desta forma, segundo estes dados, as águas coletadas nos rios Tatuoca e Massangana, encontravam-se com níveis seguros de amônia não ionizada para a realização dos testes com o ouriço-do-mar *L. variegatus*.

Entretanto, apesar do que cita a FADE (2006), outra possível fonte de poluentes pode ter sido as águas do rio Tatuoca. A nascente do rio Tatuoca está localizada em uma área cortada por rodovias e vizinha a empreendimentos industriais, com principal influência das áreas de

plantação de cana-de-açúcar da indústria sucroalcooleira. As chuvas do período de maior precipitação para o local (de abril a agosto) (LAMEPE/ITEP, 2008), podem ter lixiviado, para as águas do rio Tatuoca, resíduos dos efluentes industriais (vinhoto) e insumos utilizados nas plantações de cana-de-açúcar vizinhas (fertilizantes e/ou agrotóxicos etc.).

Em seus estudos Gunkel *et al.* (2006), avaliando a influência da indústria da cana-de-açúcar nas águas do rio Ipojuca (Ipojuca – PE), relata que os resíduos e insumos da indústria e das plantações de cana-de-açúcar, podem contaminar significativamente as águas do rio Ipojuca um ou dois dias após chuvas torrenciais. Contudo, o presente estudo só evidenciou toxicidade para os pontos do rio Tatuoca em outubro (pontos 1, 2 e 3) e dezembro (ponto 3), meses com a menor precipitação registrada para o período (LAMEPE/ITEP, 2008). Resíduos de combustíveis, lubrificantes e seus derivados, das rodovias que cruzam o local, também podem ter contribuído neste sentido. O rio Tatuoca poderia ter acumulado todos esses resíduos, durante o período chuvoso, que mostraram seus sinais logo que as chuvas diminuíram no mês de outubro.

Segundo Gunkel e seus colaboradores (2006), o impacto dos efluentes das plantações de cana-de-açúcar (vinhoto) nas águas do rio Ipojuca é demonstrado pelas mudanças na concentração de oxigênio, sendo os valores mínimos encontrados na estação seca (de outubro a março). Algo semelhante pode ocorrer às águas dos rios Tatuoca e Massangana e, conseqüentemente, às águas do complexo estuarino de Suape, pois estão localizados em área muito próxima a do rio Ipojuca e aos mesmos fatores que influenciam na qualidade de suas águas. No presente estudo, justamente em outubro foram encontrados os piores resultados.

Os dados obtidos na análise do mês de dezembro de 2007, período de estiagem, mostram que os pontos 1 e 2 não apresentaram mais toxicidade apesar dos demais pontos ainda apresentarem. As coletas foram realizadas na maré enchente entre as 10:00 e 11:30 horas da manhã (baixa mar 10:34 – 0,5 m; Tabela 1). Nestes horários a altura da maré estava entre 0,6 – 0,8 m, aproximadamente. As estações de coleta apresentaram águas com salinidades muito altas (39 – 40; Tabela 1), mostrando forte influência das águas marinhas, provavelmente pelo fato do período de estiagem diminuir a força das águas dos rios e da maré ter começado a encher.

O período de estiagem pode explicar a presença dos sinais de recuperação dos pontos de coleta 1 e 2, pois a forte influência exercida pelas águas do rio Massangana sobre às do rio Tatuoca, pode ter diminuído pela falta das chuvas e pela maior influência das águas marinhas.

A obra da estrada que cruza o rio Tatuoca, observada em seu período inicial no mês de outubro, no mês de dezembro já se encontrava quase concluída e barrando, consideravelmente, as águas do rio Tatuoca, fazendo com que as águas marinhas tivessem maior influência naquele momento.

Sendo assim, caso a toxicidade encontrada no mês de outubro de 2007 fosse originária exclusivamente do canal de navegação e da área interna do porto de Suape, deveria ter se repetido em dezembro, porém não foi o que ocorreu. Em dezembro, os pontos de coleta 1 e 2 não apresentaram toxicidade. O ponto 4 ainda mostrava sinais de toxicidade, porém também indicava sinais de recuperação, seguido do ponto 3 (Figura 6). Estes resultados corroboram a hipótese na qual o porto interno de Suape, até o momento, não é considerado responsável principal pelos sinais de poluição encontrados na área. Os resultados obtidos na análise do mês de dezembro de 2007, também reforçam a hipótese na qual as águas do rio Tatuoca, junto com às do rio Massangana, são as principais responsáveis pelo carreamento de substâncias tóxicas para o Complexo Estuarino de Suape.

Os resultados obtidos no presente trabalho são referentes a efeitos crônicos de curta duração observados no desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, indicando assim que a região estudada ainda não se encontra em condições alarmantes de poluição, mas que sinais do impacto causado pelas atividades porto-industriais implantadas na região, e outras atividades existentes em seu entorno (como a indústria sucroalcooleira), já estão sendo percebidos e identificados nos ecossistemas que compõe o Complexo Estuarino de Suape.

A região carece de monitoramento constante para acompanhar e mitigar os possíveis impactos causados pelo crescimento e ampliação do Complexo Porto-Industrial de Suape. O presente estudo é apenas uma parte pequena do trabalho que deve ser realizado na região.

Ainda são necessários mais estudos de monitoramento para se compreender, de maneira mais efetiva, os principais aportes de poluição que comprometem a saúde ambiental do Complexo Estuarino de Suape.

Análises ecotoxicológicas com amostras não só da água, mas também do sedimento, são necessárias para melhor compreensão do processo de acumulação e biodisponibilização de possíveis poluentes originários das atividades porto-industriais executadas nesta região.

6. CONCLUSÕES

- Embasando-se nas recomendações das Normas consultadas, os dados obtidos em relação a CE_{50} de DSS para *L. variegatus* podem ser considerados válidos para iniciar a confecção de uma carta-controle;
- O valor da CE_{50} de DSS encontrada para *L. variegatus*, no presente estudo, está próximo aos valores encontrados por outros trabalhos que avaliaram a sensibilidade de outras espécies de ouriço-do-mar ao DSS, além do *L. variegatus*;
- Existe a necessidade de mais ensaios ($n = 20$) com a substância de referência DSS para se verificar a consistência na sensibilidade e na precisão nos dados sobre a população local de *L. variegatus* a esta substância;
- Atualmente, a metodologia de ensaio com o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar já faz parte da rotina dos experimentos ecotoxicológicos realizados pelo LACE;
- Os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma provável diferença na disponibilidade de contaminantes entre as estações seca e chuvosa. As variações de maré também podem ter influenciado na disponibilidade e concentração desses contaminantes;
- A toxicidade nas águas superficiais do Complexo Estuarino de Suape, para o período estudado, é mais importante ao final do período chuvoso (agosto) e no início do período de estiagem (outubro). Os locais mais afetados por esta toxicidade estão localizados mais próximos ao estuário do rio Massangana.

7. BIBLIOGRAFIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas e Técnicas) (2006). **Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração.** Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma técnica NBR 15.350, RJ, ABNT, 17p.
- ABESSA, D. M. S. & SOUSA, E. C. P. M. (2003). Sensitivity of the Amphipod *Tiburonella viscana* (Platyischnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 46, No. 1, pp. 53-55.
- ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P. & COSTA, M. F. (2006). Avaliação da toxicidade dos sedimentos do porto de SUAPE utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* nos períodos seco e chuvoso. In. RELINE – Resíduos Líquidos do nordeste. **Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo – 1ª Coletânea de trabalhos técnicos.** Recife, Ed. Universitária de UFPE. pp. 47-60.
- BEIRAS, R.; BELLAS, J.; FERNÁNDEZ N.; LORENZO, J. I. & COBELO-GARCÍA. (2003). Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*, v. 56, pp. 531-553.
- BELLAS, J.; BEIRAS, R.; MARIÑO-BALSA, J. C. & FERNÁNDEZ, N. (2005). Toxicity of Organic Compounds to Marine Invertebrate Embryos and Larvae: A Comparison Between the Sea Urchin Embryogenesis Bioassay and Alternative Test Species. *Ecotoxicology*, v. 14, pp. 337-357.
- BÖTTGER, S.A. & McCLINTOCK, J.B. (2001). The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Part C129, pp. 307-315.
- CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R. & MARÍN, A. (2002). Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Ciencias marinas*, v. 28, No. 04, pp. 407-417.
- 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 Portman Bay. *Scintia Marina*, v. 68, pp. 205-213.

- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (1999). **Água do mar: teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)**. Método de ensaio. Norma técnica L 5.250, São Paulo, Cetesb, 22p.
- FADE/UFPE – Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Federal de Pernambuco. (2006). REFINARIA DO NORDESTE – Abreu e Lima. **Relatório de Impacto ambiental**. Pernambuco, Recife, 77p.
- GHIRARDINI, A. V.; NOVELLI, A. A. & TAGLIAPIETRA, D. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environment International*, v. 31, pp. 1065-1077.
- 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*, DOI 10.1007/s11270-006-9268-x
- KOBAYASHI, N. & OKAMURA, H. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development.1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, v. 55, pp. 1403-1412.
- KOENING, M. L.; LEÇA, E. E.; NEUMANN-LEITÃO, S. & MACÊDO, S. J. (2003). Impacts of the construction of the Port of Suape on phytoplankton in Ipojuca river estuary (Pernambuco – Brasil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, No. 01, pp. 73-81.
- LAMEPE/ITEP – Laboratório de Meteorologia de Pernambuco do Instituto de Tecnologia de Pernambuco. (2008). www.itep.br/LAMEPE.asp (acessado em 15.Set.2008).
- LORENZO, J. I.; NIETO, O. & BEIRAS, R. (2002). Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquatic Toxicology*, v. 58, pp. 27-41.
- LOSSO, C.; NOVELI, A.A.; PICONE, M.; MARCHETTO, D.; PANTINE, C.; GHETTI, P.F. & GHIRARDINI, A.V. (2007). Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 66, pp. 252-257.

- MENDONÇA, V. S. (2005). Avaliação da toxicidade aguda de efluentes industriais do riacho Algodois. Recife: Agência Estadual de meio Ambiente e Recursos Hídricos – CPRH. 22p.
- MUNIZ, K.; NETO, B. B.; MACÊDO, S. J. & PINHEIRO FILHO, W. C. (2005). Hydrological Impact of the Port Complex of Suape on the Ipojuca River (Pernambuco – Brazil). *Journal of Coastal Research*. v. 21, No. 5, pp. 909-914.
- NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M. & NIPPER, M. (2002). **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. São Paulo, Artes Gráficas e Indústria Ltda, 262p.
- NEUMANN, V. H.; MEDEIROS, C.; PARENTE, L.; LEITÃO, S. N. & KOENING, M. L. (1998) Hydrodynamism, Sedimentology, Geomorphology and Plankton Changes at Suape Area (Pernambuco – Brazil) after a Port Complex Implataion. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 70, No. 2 pp. 313-323.
- NILIN, J.; CASTRO, C. B.; PIMENTEL, M. F.; FRANKLIN JÚNIOR, W.; MATOS R.F. G.; LOTUFO T. M. C. & COSTA-LOTUFO, L. V. (2007). Water Toxicity Assessment of the Ceará River Estuary (Brazil). *Journal of the brazilian society of ecotoxicology*, v. 2, No. 2, pp. 107-113.
- PUSCEDDU, F. H.; ALEGRE, G. F.; PEREIRA, C. D. S. & CESAR, A. (2007). Avaliação da toxicidade do sedimento do complexo estuarino de Santos empregando ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata). *Journal of the brazilian society of ecotoxicology*, v. 2, No. 3, pp. 237-242.
- SOUZA, M. M. A. & SAMPAIO, E. V. S. B. (2001). Variação temporal da estrutura dos bosques de mangue de Suape – PE após a construção do porto. *Acta botânica brasileira*, v. 15, No. 1, pp. 1-12.
- STEEVENS, J.A.; SLATTERY, M.; ARYL, A. & BENSON, W.H. SCHLENK, D.; (1999) Effects of ultraviolet-B light and polyaromatic hydrocarbon exposure on sea urchin development and bacterial bioluminescence. *Marine environmental research*, v. 48, pp. 439-457.
- SIKAVUOPIO, S.I.; DALE, T.; FOSS, A. & MORTENSEN, A. (2004) Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, v. 242, pp. 313-320.

U.S. EPA (Environmental Protection Agency). (1991) **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**. EPA- 600-FR-91/001. Washington, USA, Federal Register 56(254):63798-63826.

U.S. EPA (Environmental Protection Agency). (1994) **Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms**. EPA/600/4-91/003. Washington, USA, Second Edition, 437p.

CAPÍTULO II

Avaliação Toxicológica de Sedimentos Utilizando o Echinodermata *Lytechinus variegatus* e o Copepoda *Tisbe biminiensis* como Organismos-teste em Diferentes Métodos

RESUMO

Por ter a capacidade de concentrar substâncias orgânicas e inorgânicas, o sedimento torna-se um dos compartimentos mais importantes na avaliação toxicológica dos ecossistemas aquáticos. As variáveis nos ensaios toxicológicos com sedimentos podem envolver a duração do ensaio, os organismos-teste utilizados, a metodologia e a fase do sedimento a ser testada (fração sólida ou líquida). O presente estudo avaliou as respostas apresentadas pelos organismos-teste, *Lytechinus variegatus* e *Tisbe biminiensis*, utilizados nas metodologias da fase sólida (sedimento integral), do elutriato e da interface sedimento-água. O sedimento controle foi coletado no estuário do rio Maracaípe – PE e o sedimento teste foi coletado no estuário do rio Massangana (Suape – PE), nos meses de outubro e dezembro de 2007. Os testes utilizando o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, não puderam ser validados, pois o percentual de indivíduos em estágio de larva pluteus, no controle, foi abaixo do exigido pelas Normas Técnicas consultadas. Em outubro e dezembro de 2007, a sobrevivência das fêmeas de *T. biminiensis*, segundo o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, não apresentou diferenças significativas entre as médias das estações de coleta, sendo assim, o sedimento testado não provocou efeito letal. Em outubro de 2007, a fecundidade e o número de copepoditos na prole, segundo a ANOVA bi-fatorial, apresentaram diferenças significativas entre as médias das estações de coleta (na metodologia da fase sólida), dessa forma, evidenciando que o sedimento testado provocou efeito subletal em *T. biminiensis*. Em dezembro de 2007, apenas o número de copepoditos na prole, segundo a ANOVA bi-fatorial, apresentou diferenças significativas entre as médias das estações de coleta (na metodologia da fase sólida). As metodologias do elutriato e da interface sedimento-água não evidenciaram qualquer efeito tóxico do sedimento testado (seja agudo ou crônico) para *T. biminiensis*. Este fato pode estar relacionado com o tipo de poluente e a qual fração do sedimento ele está mais ligado. Os resultados do presente estudo sugerem que substâncias tóxicas (a exemplo dos hidrocarbonetos ou metais pesados) podem estar ligadas às partículas finas do sedimento (fração sólida < 63µm) e que substâncias tóxicas, tais como a amônia não-ionizada, podem ser disponibilizadas à água sobrejacente após ação mecânica que promova revolvimento dos sedimentos, ou pelo fluxo de substâncias através da interface sedimento-água sobrejacente.

Palavras – chave: *Tisbe biminiensis*, toxicidade, elutriato, interface sedimento-água.

1. INTRODUÇÃO

O crescente acúmulo de compostos químicos no ambiente aquático tem causado efeitos tóxicos para a biota de vários ecossistemas. A industrialização e urbanização em áreas litorâneas vêm contribuindo para a contaminação e degradação de ambientes costeiros através da poluição química e física, colocando em risco o equilíbrio de ecossistemas importantes a exemplo das baías, dos estuários e dos manguezais (Araújo-Castro et al., 2009; Moore et al., 2004; Onorati et al., 1999; Souza & Sampaio, 2001).

A consequência desta situação é que grande parte do desequilíbrio ambiental gerado pelos resíduos industriais, esgotos domésticos e destruição de habitats naturais (pela ação antrópica) ocorrem em áreas de grande significância biológica e econômica que são susceptíveis a impactos ecológicos e ambientais. Além disso, os contaminantes que acompanham tais resíduos, ainda podem ser acumulados no tecido animal e, transferidos através da teia alimentar, trazer também, prejuízos ao homem, representando uma importante fonte de riscos à saúde pública através da ingestão de frutos do mar contaminados (Moore et al., 2004; Abessa et al., 2006).

No entanto, alguns resíduos químicos, que inicialmente contaminam as águas dos ecossistemas costeiros, tendem persistir no ambiente aquático depositando-se e associando-se aos sedimentos. Desta forma, os sedimentos podem agir como um compartimento reservatório (uma fonte crônica de contaminantes) de alguns compostos químicos persistentes que possuam, por exemplo, metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sua composição. Tais compostos, quando se tornam biodisponíveis, podem agir de forma teratogênica, deletéria, ou acumular-se nos tecidos dos organismos, causando efeitos agudos (letalidade) e/ou crônicos (reprodução) às comunidades bióticas que vivem ou entram em contato com este sedimento contaminado (Pusceddu et al., 2007; Geffard et al., 2003; Green et al., 1993; Abessa et al., 2006; Hyötyläinen & Oikari, 1999; Baumard et al., 1998).

Por ter a característica de acumular contaminantes orgânicos e inorgânicos (de origem antropogênica ou não), o sedimento torna-se um dos compartimentos mais importantes a serem estudados na avaliação toxicológica dos ecossistemas aquáticos. Contudo, para tais contaminantes tornarem-se biodisponíveis, principalmente quando se trata de sedimentos estuarinos, dependem das características físico-químicas e geológicas dos sedimentos e das características biológicas, fisiológicas e ecológicas da biota, que podem interferir neste processo

(Pusceddu et al., 2007; Abessa et al., 2006; Baumard et al., 1998; Chapman, 2002; Moore et al., 2004; Beiras et al., 2003a e b).

As análises químicas foram as primeiras abordagens na avaliação da contaminação dos sedimentos. Porém, isoladamente, tais análises consistem em identificar e quantificar a contaminação no sedimento. Da mesma forma, avaliações toxicológicas, ecológicas ou ambientais, isoladamente, não vão identificar os compostos químicos responsáveis pelos efeitos biológicos observados (Abessa et al., 2006; Chapman, 2002; Chapman et al., 2002).

As estratégias de monitoramento da poluição marinha frequentemente empregam a integração de parâmetros químicos e biológicos nas avaliações de risco ambiental, através do emprego de estudos de toxicologia ambiental e/ou ecotoxicológicos. Em geral, estudos toxicológicos (ambientais e ecológicos), procuram entender os tipos de efeitos causados por substâncias químicas, os processos bioquímicos e fisiológicos responsáveis por tais efeitos e a sensibilidade de diferentes tipos de organismos expostos a estas substâncias (Onorati et al., 1999; Beiras et al., 2003b; Geffard et al., 2003; Pusceddu et al., 2007; Abessa et al., 2006; Chapman, 2002; Chapman et al., 2002; Moore et al., 2004).

No estudo toxicológico dos sedimentos, é importante avaliar as duas principais vias de exposição: a fração líquida do sedimento e a fração sólida. As metodologias utilizando a água intersticial, elutriato e interface sedimento-água (ISA), são as mais frequentes técnicas de investigação para a compreensão dos efeitos biológicos da fase solúvel dos poluentes. Testes com a fase sólida do sedimento (sedimento integral), podem ser realizados com sedimento integral coletado em campo ou com sedimento preparado em laboratório a partir da adição de substâncias (Abessa et al., 2006; Araújo-Castro et al., 2009; Green et al., 1993; Pusceddu et al., 2007).

No presente estudo, serão utilizadas as metodologias da fase sólida, do elutriato e da interface sedimento-água; juntamente com os organismos-teste *Lytechinus variegatus* e *Tisbe biminiensis*. A metodologia da fase sólida utiliza organismos representativos do bentos (epibentônicos) nos ensaios toxicológicos, permitindo a exposição destes organismos-teste aos possíveis contaminantes existentes associados ao sedimento, via ingestão e/ou contato direto (Araújo-Castro et al., 2009; Araújo-Castro, 2008; Green et al., 1993).

A metodologia do elutriato realiza a agitação do sedimento com a água de diluição (água do mar filtrada), com posterior separação da parte líquida, parte esta utilizada no ensaio toxicológico. Este método permite a utilização também de organismos não representativos do

bentos. O método do elutriato expõe os organismos-teste aos possíveis contaminantes existentes no sedimento, agora dispersos na coluna d'água, que estejam biodisponíveis, via contato direto (e via ingestão, no caso dos organismos filtradores) (ABNT, 2006; Geffard et al., 2003; Abessa et al., 2006).

A metodologia da interface sedimento-água não permite o contato direto entre os organismos-teste e o sedimento, pois, estes são separados por uma malha. Também não permite efeitos via ingestão, permitindo apenas o contato com a fase solúvel dos contaminantes que, por ventura, estejam saindo do sedimento e se disponibilizando na água sobrejacente (ABNT, 2006; Pusceddu et al., 2007; Anderson et al., 2001).

Para cada tipo de metodologia utilizada, será necessário um organismo-teste aplicável a ela. Existem organismos-teste que são viáveis a mais de um tipo de metodologia, desta forma, tornando possível a investigação de diferentes frações do sedimento ao mesmo tempo e com o mesmo organismo. O modelo adequado de organismo-teste deve pertencer a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos, pois, sua posição na cadeia alimentar marinha é muito importante, em especial no que se refere à transferência de energia. E por razões práticas, esse organismo deve ser abundante, de fácil obtenção, amplamente distribuído, gerenciável experimentalmente em laboratório, além de já ter sido alvo de estudos ecotoxicológicos anteriores (Chapman, 2002; Raisuddin et al., 2007; Araújo-Castro et al., 2009; Beiras et al., 2003a).

Entre outras espécies, o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* é um dos animais marinhos mais utilizados como organismo-teste em bioensaios de poluição marinha. Isso se deve ao seu grande alcance geográfico e abundância, tornando-o uma espécie potencialmente importante, podendo prover um rápido e sensível modelo para avaliação de contaminantes. Diferentes anomalias no desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar são induzidas pelas águas poluídas contendo metais pesados, HPAs entre outros poluentes (ABNT, 2006; CETESB, 1999; Böttger & McClintock, 2001; Kobayashi & Okamura, 2004; Siikavuopio et al., 2004; Cesar et al., 2004; Losso et al., 2007; Pusceddu et al., 2007). A ABNT (2006) indica a utilização do desenvolvimento embriolarval destes organismos nos ensaios com água intersticial, elutriato e interface sedimento/água.

Os copépodos marinhos harpacticóides bentônicos do gênero *Tisbe* vêm sendo frequentemente utilizados em testes letais e subletais de toxicidade, em função de sua facilidade

de cultivo, facilidade de alimentação, alta fecundidade e resistência às condições laboratoriais. O gênero *Tisbe* também possui outras vantagens, tais como um ciclo de vida curto, tamanho reduzido e sensibilidade a um grande número de substâncias químicas. O seu tamanho reduzido facilita a realização dos testes, barateando os mesmos, e seu hábito epibentônico possibilita testar poluentes tanto na fase aquosa quanto aqueles ligados aos sedimentos (Miliou et al., 2000; Thomas et al., 2003; Araújo-Castro et al., 2009; Souza-Santos et al., 2006; Pinto et al., 2001) Bengtsson, 1978; Hutchinson et al., 1999).

Desta forma, o presente estudo avaliou as respostas do desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* e da sobrevivência e fecundidade do Copepoda *T. biminiensis*, aos sedimentos dos estuários dos rios Maracaípe e Massangana, com base nas metodologias da fase sólida (sedimento integral), do elutriato e da interface sedimento/água.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Utilizar as metodologias da fase sólida, do elutriato e da interface sedimento/água na avaliação toxicológica do sedimento do Complexo Estuarino de Suape, com dois organismos-teste diferentes: o Echinodermata Echinoidea *Lytechinus variegatus* LINNAEUS 1758 e o Copepoda Harpacticoida *Tisbe biminiensis* VOLKMANN-ROCCO 1973.

2.2. Objetivos Específicos

- Utilizar a metodologia de fase sólida usando como parâmetro de resposta a sobrevivência, a fecundidade e o número de copepoditos na prole do Copepoda *T. biminiensis*;
- Utilizar a metodologia do elutriato usando como parâmetro de resposta o desenvolvimento embriolarval do pluteus do ouriço-do-mar *L. variegatus* e a sobrevivência, a fecundidade e o número de copepoditos na prole do Copepoda *T. biminiensis*;
- Utilizar a metodologia da interface sedimento-água usando como parâmetro de resposta o desenvolvimento embriolarval do pluteus do ouriço-do-mar *L. variegatus* e a sobrevivência, a fecundidade e o número de copepoditos na prole do Copepoda *T. biminiensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) do Departamento de Oceanografia, Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.1. Método de Ensaio com *Lytechinus variegatus*

Os testes de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pelas Normas Técnicas ABNT NBR 15350:2006 e CETESB L5. 250 – Maio/99. Embriões de ouriço-do-mar *L. variegatus* foram expostos por 28 horas às amostras recém processadas de sedimento e, após este período de exposição, foi avaliado o número de larvas apresentando desenvolvimento normal e anômalo. Toda metodologia executada para se utilizar o ouriço-do-mar *L. variegatus* como organismo-teste em bioensaios de toxicologia, encontra-se descrita no Capítulo I deste documento.

3.2. Cultivo do Copepoda *Tisbe biminiensis*

O cultivo de manutenção foi realizado em potes plásticos com 500 ml de água do mar filtrada (filtros CUNO[®] 25 e 3µm), salinidade de $35 \pm 2\text{‰}$, temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12 horas de claro:escuro. A troca de água e a adição de alimento (ração básica para peixe da marca All Plus[®] e suspensão de diatomáceas) foram realizadas uma vez por semana. Para a obtenção de grande quantidade de fêmeas ovadas, na ocasião da execução dos experimentos, o recipiente de cultivo é aumentado para 5 litros (Souza-Santos et al., 2006; Araújo-Castro et al., 2009).

3.3. Cultivo de Microalgas

As microalgas utilizadas como alimento são diatomáceas (Bacillariophyceae) das espécies *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetocerus muelleri*. O meio de cultivo utilizado para as diatomáceas foi o f/2 de Guillard (1975). Para a preparação do meio foi utilizada água do mar filtrada (filtros CUNO[®] 25 e 3µm) a $35 \pm 1\text{‰}$. O tampão Tris-HCl (pH = 7,8) e os nutrientes f/2 foram adicionados antes da esterilização do meio de cultivo em autoclave. A solução de vitaminas (esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 µm) foi adicionada ao meio, quando o mesmo

encontrava-se em temperatura ambiente e antes da inoculação da alga. Os cultivos foram realizados no LACE com temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), com fotoperíodo de 12:12 horas de claro:escuro (Araújo-Castro & Souza-Santos, 2005; Lima et al., 2007).

3.4. Obtenção das Fêmeas de *T. biminiensis*

As fêmeas de *T. biminiensis* utilizadas no teste tinham 12 dias de idade, buscando assim, minimizar a mortalidade natural pelo envelhecimento das fêmeas, devido ao curto ciclo de vida de *T. biminiensis* (cerca de 31 dias). Para obtenção das fêmeas com essa idade, 13 dias antes da execução dos experimentos, todo grupo de copépodos das caixas de cultivo de manutenção foi filtrado através de uma peneira de malha $250\mu\text{m}$, sendo retidos principalmente os adultos e colocados em recipientes plásticos com capacidade para 20 L, contendo 5 L de água do mar, alimento e deixados por 24 h a $35 \pm 2\text{‰}$ de salinidade. Após 24 horas, filtrou-se novamente o conteúdo da caixa de cultivo por uma peneira de $250\mu\text{m}$ e por uma peneira de $63\mu\text{m}$. Desta vez, apenas o conteúdo retido na peneira de $63\mu\text{m}$ foi aproveitado (os náuplios). A partir daí contou-se 12 dias de desenvolvimento dos náuplios e apenas as fêmeas, portando saco ovífero, foram utilizadas para realização dos testes. O alimento (200 ml de suspensão de diatomáceas e 1 g de ração para peixe) era oferecido duas vezes por semana, assim como a renovação da água do cultivo. O cultivo foi mantido sob constante aeração (Pinto et al., 2001; Lima et al., 2007; Araújo-Castro et al., 2009).

3.5. Obtenção do Sedimento

O sedimento utilizado na realização dos experimentos foi coletado nos meses de outubro e dezembro de 2007, em duas regiões distintas do município de Ipojuca – PE:

- Estuário do rio Maracaípe ($08^\circ32'19.30''\text{S}$ e $35^\circ00'14.99''\text{W}$). Esta área encontra-se afastada de grandes centros urbanos e indústrias, sendo assim, seu sedimento foi considerado como controle (Araújo-Castro et al., 2009);
- Estuário do rio Massangana. Este estuário está localizado no Complexo Estuarino de Suape, que faz parte da área interna do Complexo Porto-Industrial de Suape ($8^\circ23'30.56''\text{S}$; $34^\circ57'38.00''\text{W}$) (ver Capítulo I) e seu sedimento já apresentou toxicidade sendo por isto considerado como sedimento teste (Araújo-Castro et al., 2009; Araújo-Castro, 2008).

Em cada estação de coleta foram colhidas de 3 a 4 amostras para avaliar a variabilidade espacial. O sedimento superficial (2 – 5 cm) foi coletado sempre durante a maré baixa e no médio litoral, com auxílio de uma espátula metálica.

Fase sólida: foram coletadas 3 amostras de 100g de sedimento com aspecto lamoso. Cada amostra consistia de uma camada de cerca de 5 cm de profundidade que foi coletada e acondicionada em recipiente de vidro e transferida para laboratório sob refrigeração em caixa térmica com gelo.

Elutriato: foram coletadas três amostras de, aproximadamente, 150g cada, sendo transferidas para o laboratório acondicionadas em recipientes de vidro sob refrigeração em caixa térmica com gelo.

Interface sedimento/água: o sedimento para a metodologia da interface sedimento/água foi coletado através de tubos confeccionados a partir de seringas descartáveis de 20 ml. Foram coletadas 4 amostras da parte superficial do sedimento com aspecto lamoso com cerca de 5 cm de profundidade. Essas amostras foram imediatamente colocadas em seus respectivos recipientes para a realização dos testes, confeccionados a partir de seringas descartáveis de 60 ml (Figura 1), sendo acondicionadas em caixa térmica com gelo e levados ao laboratório.

3.6. Testes com o Sedimento

Em laboratório, as amostras de sedimento foram tratadas de acordo com a metodologia a qual foram submetidas a teste.

Fase sólida: Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita por Araújo-Castro et al. (2009) e Araújo-Castro (2008). Nesta metodologia só foi utilizado o Copepoda Harpacticoida *T. biminiensis* como organismo-teste. As amostras de sedimento coletadas eram peneiradas para remoção de possíveis predadores em peneiras com malha de 63 μm com auxílio de água do local de coleta. A fração < 63 μm era deixada sedimentar por aproximadamente 10 horas, em recipientes de vidro, em geladeira a 4°C. O sobrenadante era retirado e três subamostras de 2 g de sedimento foram retiradas de cada uma das 3 amostras. Estas sub-amostras foram colocadas em recipientes-testes de vidro com 20 ml de suspensão de diatomácea a 0,2 μg Chl-a./ml/L, e levados a uma estufa-incubadora por 24 h. Ao final deste período, cada recipiente-teste recebia 10 fêmeas ovadas.

Os bioensaios tiveram duração de uma semana (7 dias), onde permaneciam em estufa-incubadora com temperatura a 25°C e fotoperíodo de 12:12 horas claro:escuro. A cada dois dias era adicionado 1 ml de suspensão de diatomácea para que não houvesse falta de alimento durante o experimento.

No final do experimento o sedimento era retirado com ajuda de uma peneira com malha de 63 µm e o material era fixado em formol a 4% e corado com Rosa Bengala, para contagem da prole (efeito subletal) e das fêmeas coradas o que indicava que estavam vivas ao final do teste (efeito letal).

Elutriato: a metodologia do elutriato seguiu as recomendações da U.S.EPA (2001). Cada uma das 3 amostras de 100g dos sedimentos coletados foram colocadas em recipientes de polietileno onde receberam a adição de 400 ml de água de diluição marinha filtrada, sendo homogeneizadas, manualmente, por 30 minutos. Após a homogeneização, as amostras permaneceram em repouso por 24 horas em geladeira a 4°C. Posteriormente, quando retiradas da geladeira, e após terem atingido temperatura ambiente, o sobrenadante (elutriato) de cada recipiente foi sifonado, completando o volume necessário para ser colocado em cada recipiente-teste. No caso dos recipientes para *T. biminiensis*, cada amostra formou 3 subamostras de 20 ml cada, formando um total de 9 subamostras. Cada subamostras recebeu, além dos 20 ml de elutriato, 10 fêmeas ovadas de *T. biminiensis* e 1,5 ml de alimento (suspensão de diatomáceas) a cada dois dias, para que a concentração de clorofila-a se preservasse constante a 0,2 µg Chl-a.ml/L. O bioensaio com *T. biminiensis* durou uma semana (7 dias), onde permaneceu em estufa-incubadora com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12:12 horas claro:escuro. Ao final destes 7 dias, o material era fixado em formol a 4% e corado com Rosa Bengala, para contagem da prole (efeito subletal) e das fêmeas sobreviventes (efeito letal).

No caso do bioensaio com *L. variegatus*, cada uma das 3 amostras de elutriato, forneceu 4 subamostras de 10 ml cada, formado um total de 12 subamostras. Cada subamostras foi colocada em um tubo de ensaio de vidro com capacidade para 30 ml e recebeu cerca de 300 ovos fecundados de *L. variegatus*. O bioensaio com *L. variegatus* ocorreu dentro de uma estufa-incubadora a 25°C de temperatura e fotoperíodo de 12:12 horas claro:escuro, durando 28 horas. Ao final desse período, o conteúdo de cada tubo de ensaio de vidro era transferido para outros tubos de ensaio de plástico onde eram identificados e fixados com 0,5 ml de formol tamponado com Bórax.

Interface sedimento/água: na metodologia da interface sedimento/água, adaptada da ABNT (2006), foram confeccionados recipientes-teste a partir de seringas descartáveis de 60 e 20 ml. As seringas de 60 ml tiveram suas extremidades abertas, porém, para reter o sedimento uma delas foi tampada com o êmbolo de borracha da própria seringa. As de 20 ml tiveram uma de suas extremidades aberta e outra fechada com uma tela de malha de 63 μm (removível) para retenção e proteção dos organismos-teste. Os recipientes-teste de 60 ml receberam o sedimento ainda em campo sem destruir sua estratificação. Quando em laboratório, os recipientes-teste de 60 ml, recebiam também os recipientes de 20 ml, equipados com a malha de 63 μm (Figura 1). Logo depois eram colocados a água de diluição marinha filtrada (filtros CUNO[®] 25 e 3 μm) e seus respectivos organismos-teste. Para cada organismo-teste existiam 8 recipientes, sendo 4 para o controle e 4 para o sedimento teste.

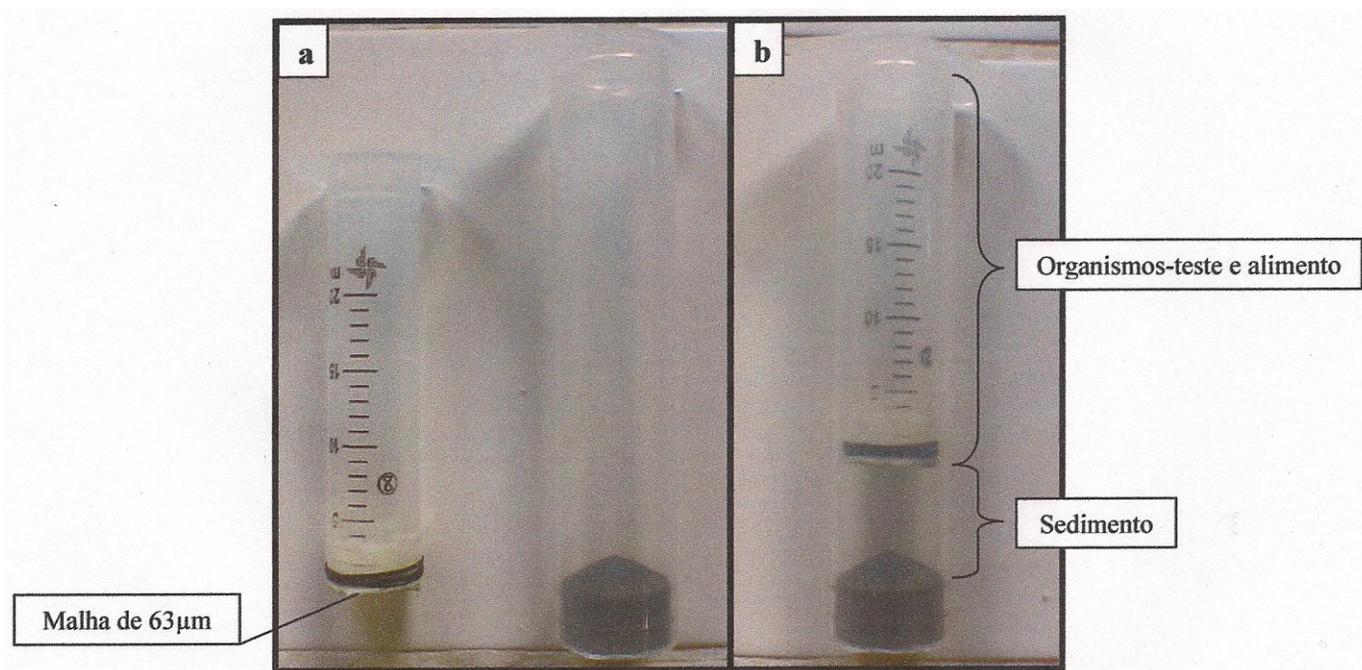


Figura 1. Foto dos recipientes utilizados na metodologia da interface sedimento/água. a) Recipientes de 20 e 60 ml e b) Recipiente de 20 ml, inserido no de 60 ml.

No caso dos recipientes para *T. biminiensis*, cada um recebeu 30 ml de água de diluição marinha filtrada, 10 fêmeas ovadas e 1,5 ml de alimento (suspensão de diatomáceas) a cada dois dias para que a concentração de clorofila-a se preservasse constante a 0,2 $\mu\text{g Chl-a.ml/L}$. O bioensaio com *T. biminiensis* durou sete dias em estufa incubadora a 25° C. No final, todo conteúdo retido nos recipientes de 20 ml foi transferido para potes plásticos, identificado, fixado

com formol a 4% e corado com Rosa Bengala, para contagem da prole (fecundidade) e do total de fêmeas sobreviventes (letalidade).

No caso dos recipientes para *L. variegatus*, cada um recebeu, 30 ml de água de diluição marinha filtrada e cerca de 300 ovos fecundados de *L. variegatus*. O bioensaio com *L. variegatus* ocorreu dentro de uma estufa-incubadora a 25°C de temperatura, durando 28 horas. Ao final dessas 28 horas o conteúdo de cada recipiente era transferido para tubos de ensaio de plástico, onde eram identificados e fixados com 0,5 ml de formol tamponado com Bórax.

3.7. Parâmetros Físico-Químicos

A salinidade, a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido (O.D.) da água de cada ponto de coleta foram aferidos por meio de um refratômetro de mão, um termômetro digital, um pHmetro de campo e um oxímetro de campo, respectivamente, em campo e em laboratório (antes do início e ao final dos testes). No Laboratório de Oceanografia Química do Departamento de Oceanografia (UFPE/CTG), foram aferidos os valores de amônia não-ionizada, apenas para o método do elutriato em outubro de 2007, nas estações de coleta do controle e do estuário do Rio Massangana.

3.8. Análise dos dados

As comparações entre as metodologias e entre as estações de coleta, usando o percentual de pluteus de *L. variegatus* formados e a mortalidade e a fecundidade de *T. biminiensis*, foram feitas através da ANOVA bi-fatorial ($\alpha = 0,05$), depois da verificação da normalidade dos dados (Teste de Kolmogorov-Smirnov; $\alpha = 0,05$) e a homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett; $\alpha = 0,05$). Quando identificadas diferenças significativas, foi utilizado o teste de Tukey, considerando cada variável (metodologia e estação) em separado. Para os dados que não se apresentaram normais ou homoscedásticos, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi realizado no lugar da ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos aferidos em laboratório são apresentados na Tabela 1. Não existiram diferenças importantes nos parâmetros analisados entre os métodos e entre as estações, com exceção dos valores de amônia que foram muito mais elevados para o estuário do rio Massangana do que para o estuário do rio Maracaípe.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos nos bioensaios com *L. variegatus* e *T. biminiensis* durante os experimentos com os métodos da Fase Sólida (FS), do Elutriato (ELU) e da Interface Sedimento/Água (ISA).

ESTAÇÃO	MÉTODO	<i>Tisbe biminiensis</i>				<i>Lytechinus variegatus</i>			
		SAL	pH	O.D. (mg/L)	N-NH ₃ (mg/L)	SAL	pH	O.D. (mg/L)	N-NH ₃ (mg/L)
Controle	FS	36	7,4	4,1 - 4,9					
Out - 2007	ELU	32 - 35	7,3 - 7,4	3,5 - 5,0	0,06	35	7,9 - 8,1	3,2 - 3,8	0,06
	ISA	35	7,8	4,0 - 5,1		35	7,8	4,2	
Massangana	FS	35 - 36	7,3 - 7,5	3,2 - 3,8					
	Out - 2007	ELU	33 - 34	7,4	3,0 - 4,1	>0,96	34	7,8	3,2 - 3,9
	ISA	36	7,9	3,2 - 4,1		34	7,9	4,0	
Controle	FS	34	7,7 - 7,9	3,5 - 3,9					
Dez - 2007	ELU	35	7,8	4,5 - 5,1		33	8,0 - 8,2	3,3 - 4,0	
	ISA	35	7,6 - 8,1	3,9 - 4,1		33	8,0 - 8,1	4,5 - 5,0	
Massangana	FS	34 - 36	7,7 - 8,1	3,2 - 3,9					
	Dez - 2007	ELU	34 - 35	7,6 - 7,8	4,0 - 4,5		34	7,8 - 7,9	3,0 - 4,1
	ISA	35	7,5 - 7,8	4,1 - 4,5		34	7,7	3,3 - 3,5	

4.2. Testes com *Lytechinus variegatus* (Outubro e Dezembro de 2007)

Os testes utilizando o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, não foram válidos, uma vez que o percentual de indivíduos em estágio de larva pluteus, no controle, ao final de 28 horas, nas metodologias do elutriato e da interface sedimento/água, não atingiu o mínimo de 80%. Mesmo se tratando do sedimento controle, a metodologia do elutriato apresentou um percentual médio (outubro e dezembro de 2007) de 40,12% ($\pm 5,83\%$), de indivíduos em estágio de larva pluteus. Na metodologia da interface sedimento/água (controle), esse percentual foi zero e a maioria dos indivíduos expostos chegou apenas ao estágio de mórula, não ultrapassando o estágio de blástula (outubro e dezembro de 2007).

4.3. Testes com *Tisbe biminiensis* (Outubro de 2007)

No experimento realizado em outubro de 2007, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, indicou que para o total de fêmeas sobreviventes existiram diferenças significativas entre as metodologias utilizadas, apenas na estação controle ($T_s = 7,762$; $p = 0,020$). O mesmo teste não indicou diferenças significativas entre as metodologias utilizadas na estação de coleta do rio Massangana ($T_s = 5,566$; $p = 0,061$), e também não indicou diferenças significativas entre as estações de coleta (FS - $T_s = 0,444$ e $p = 0,504$; ELU - $T_s = 1,058$ e $p = 0,303$ e ISA - $T_s = 1,817$ e $p = 0,177$).

Na estação controle, o teste de Tukey mostrou que a média de fêmeas sobreviventes foi diferente entre as metodologias da fase sólida e da interface sedimento/água. Sendo a metodologia da fase sólida, juntamente com a metodologia do elutriato, as que obtiveram as maiores médias não demonstrando diferenças significativas entre si (Figura 2). Os controles sempre mantiveram média do total de fêmeas sobreviventes acima de 80%, neste período. Desta forma, nenhuma das metodologias utilizadas evidenciou efeito letal para o período (Figura 2).

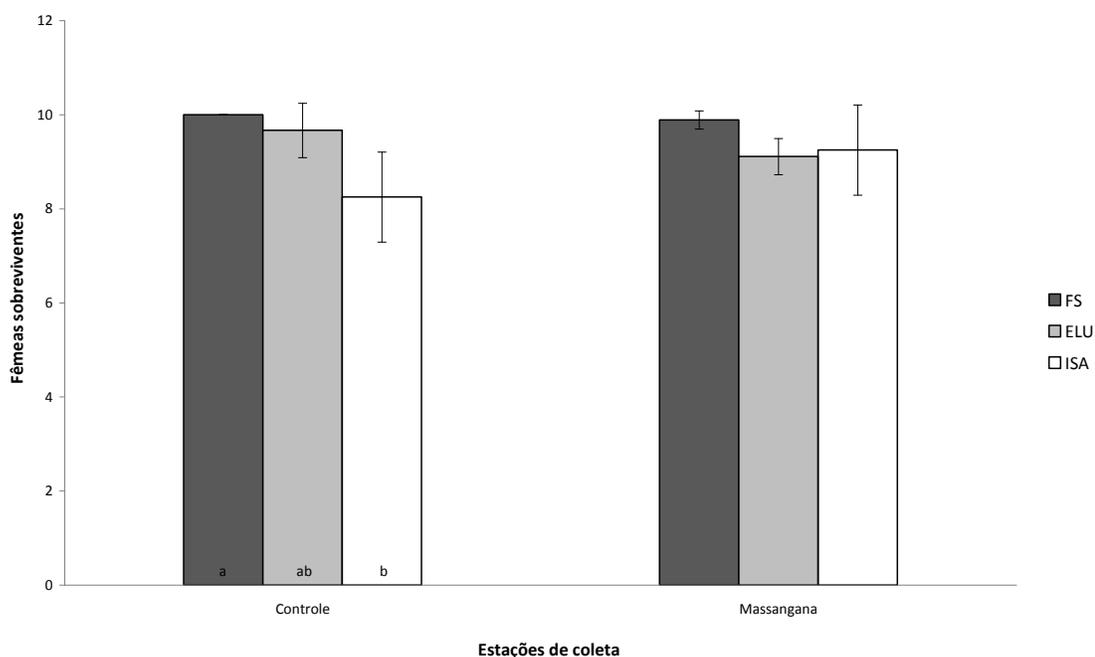


Figura 2. Média (\pm desvio padrão) do total de fêmeas vivas ao final do experimento de outubro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey na estação controle. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

Em relação aos resultados para a fecundidade, em outubro de 2007, a ANOVA bi-fatorial indicou a existência de diferenças significativas entre as metodologias utilizadas ($F = 27,691$; $p < 0,0001$) e entre as estações de coleta ($F = 4,672$; $p = 0,039$), porém não evidenciou interação entre esses dois fatores ($F = 1,749$; $p = 0,193$) (Figura 3). Na estação controle, o teste de Tukey mostrou que a média da fecundidade foi diferente entre as metodologias do elutriato e da interface sedimento/água. A metodologia do elutriato obteve a maior média de indivíduos por fêmea dentre as metodologias, sendo a interface sedimento/água a que obteve a menor média (Figura 3).

Na estação de coleta do rio Massangana, o teste de Tukey mostrou que a média da fecundidade foi diferente para as três metodologias e, novamente, a metodologia do elutriato obteve a maior média. A metodologia da interface sedimento/água continuou com a média mais baixa (Figura 3).

O teste de Tukey também mostrou que a média da fecundidade na estação de coleta do rio Massangana foi mais baixa do que a média da estação controle, na metodologia da fase sólida. Sendo assim, evidenciando que o sedimento da estação de coleta do rio Massangana provocou toxicidade subletal em *T. biminiensis* (Figura 3).

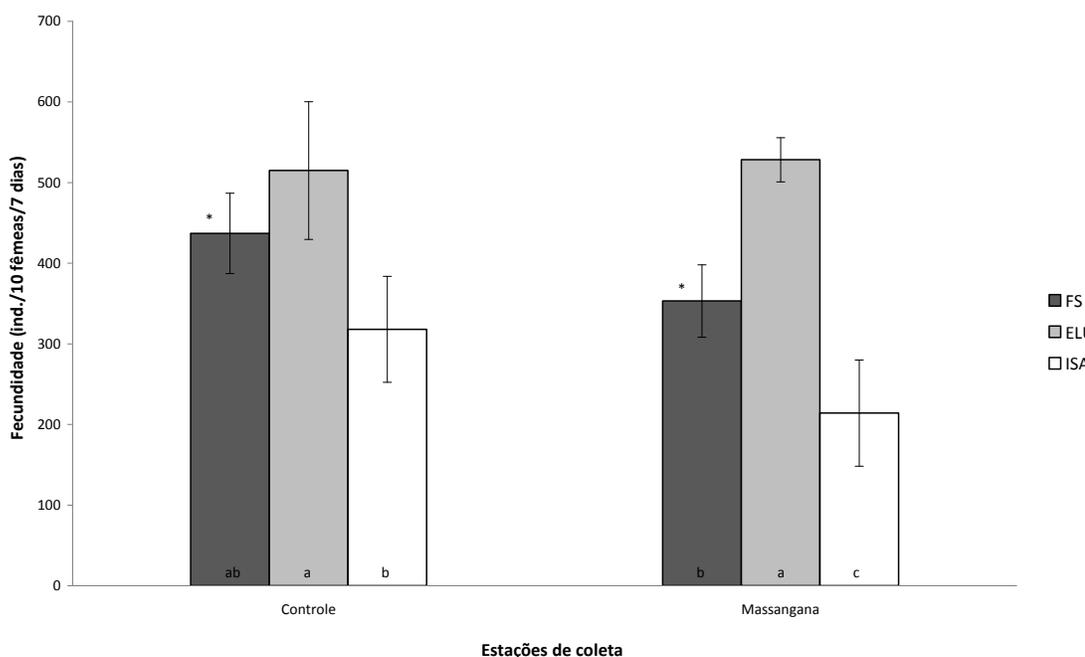


Figura 3. Média (\pm desvio padrão) da fecundidade no experimento de outubro de 2007. a, b e c = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as metodologias dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

Em relação aos resultados para a média de copepoditos na fecundidade, em outubro de 2007, a ANOVA bi-fatorial indicou que existiram diferenças significativas entre as metodologias utilizadas ($F = 55,869$; $p < 0,0001$) e entre as estações de coleta ($F = 8,897$; $p = 0,006$), porém não evidenciou interação entre esses dois fatores ($F = 0,368$; $p = 0,695$) (Figura 4).

Na estação controle, o teste de Tukey mostrou que a média de copepoditos na fecundidade, foi significativamente mais alta na metodologia da interface sedimento/água e que não existiram diferenças significativas entre as metodologias da fase sólida e do elutriato (Figura 4).

Na estação de coleta do rio Massangana, o teste de Tukey identificou que, novamente, a média de copepoditos na fecundidade para a metodologia da interface sedimento/água, foi significativamente mais alta do que as demais. Sendo a metodologia da fase sólida a que obteve a média mais baixa (Figura 4).

O teste de Tukey mostrou que a média do número de copepoditos na estação de coleta do rio Massangana foi mais baixa do que a média da estação controle (metodologia da fase sólida), evidenciando assim, que o sedimento da estação de coleta do rio Massangana provocou toxicidade subletal em *T. Biminiensis* (Figura 4).

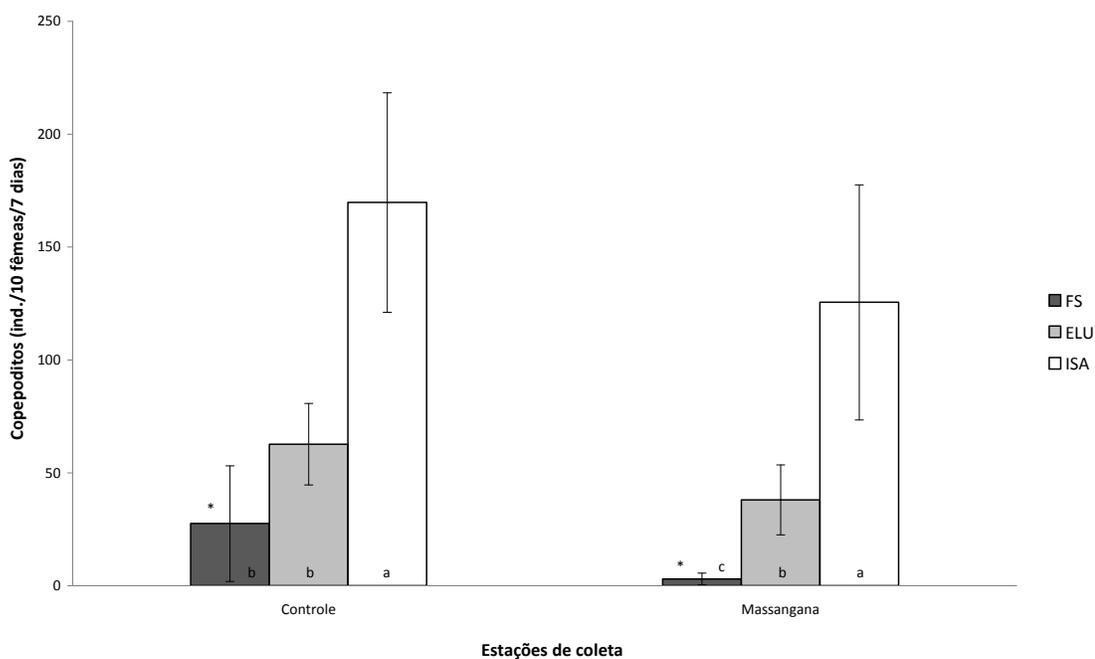


Figura 4. Média (\pm desvio padrão) do número de copepoditos na prole no experimento de outubro de 2007. a, b e c = diferenças encontradas pelo teste de Tukey dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

4.4. Testes com *Tisbe biminiensis* (Dezembro de 2007):

No experimento realizado em dezembro de 2007, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, não indicou diferenças significativas, entre as metodologias utilizadas, para nenhuma das estações de coleta (Controle: $T_s = 3,797$; $p = 0,149$ e rio Massangana: $T_s = 5,246$; $p = 0,072$). O mesmo teste também não indicou diferenças significativas entre as estações de coleta (FS - $T_s = 0,144$ e $p = 0,703$; ELU - $T_s = 1,348$ e $p = 0,245$ e ISA - $T_s = 0,022$ e $p = 0,881$) (Figura 5).

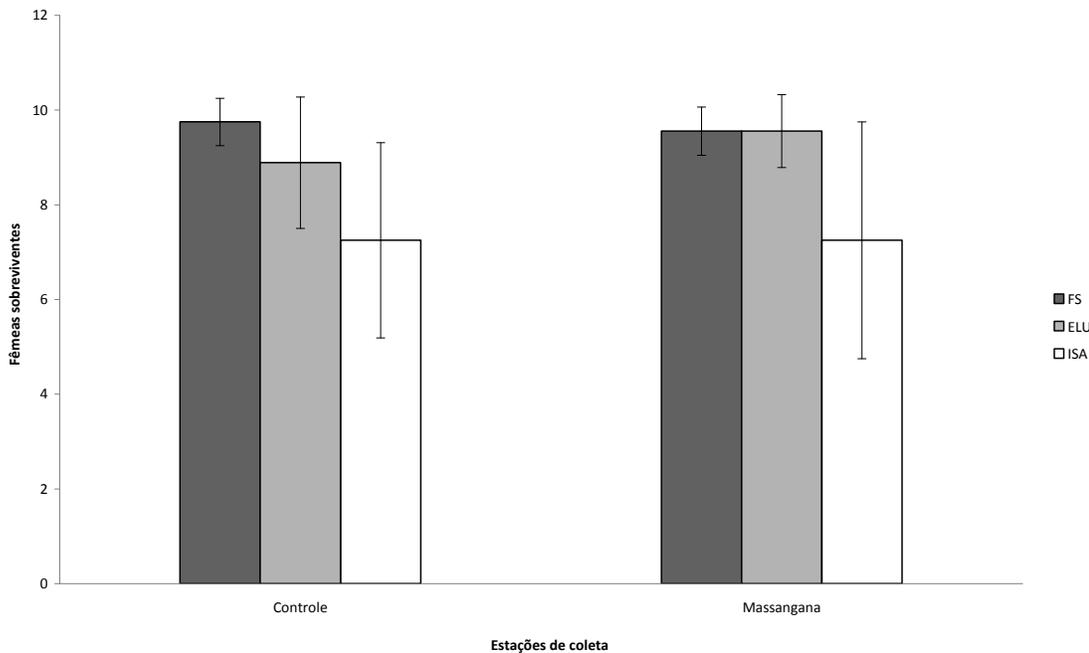


Figura 5. Média (\pm desvio padrão) do total de fêmeas vivas ao final do experimento de dezembro de 2007. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

Em relação aos resultados para a fecundidade, em dezembro de 2007, a ANOVA bifatorial indicou que existiram diferenças significativas entre as metodologias utilizadas ($F = 22,412$; $p < 0,0001$), porém não entre as estações de coleta ($F = 3,169$; $p = 0,084$). A ANOVA bifatorial também não evidenciou interação entre esses dois fatores ($F = 0,357$; $p = 0,702$) (Figura 6).

O teste de Tukey mostrou que, tanto na estação controle quanto na estação de coleta do rio Massangana, a média da fecundidade foi diferente entre as metodologias, sendo a metodologia da fase sólida a que obteve a maior média de indivíduos por fêmea, dentre as metodologias utilizadas. As metodologias do elutriato e da interface sedimento/água, não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 6).

Em relação aos resultados para o número de copepoditos na fecundidade, em dezembro de 2007, a ANOVA bi-fatorial indicou que existiram diferenças significativas entre as metodologias utilizadas ($F = 21,464$; $p < 0,0001$) e entre as estações de coleta ($F = 14,233$; $p = 0,006$), porém não evidenciou interação entre esses dois fatores ($F = 1,248$; $p = 0,300$) (Figura 7).

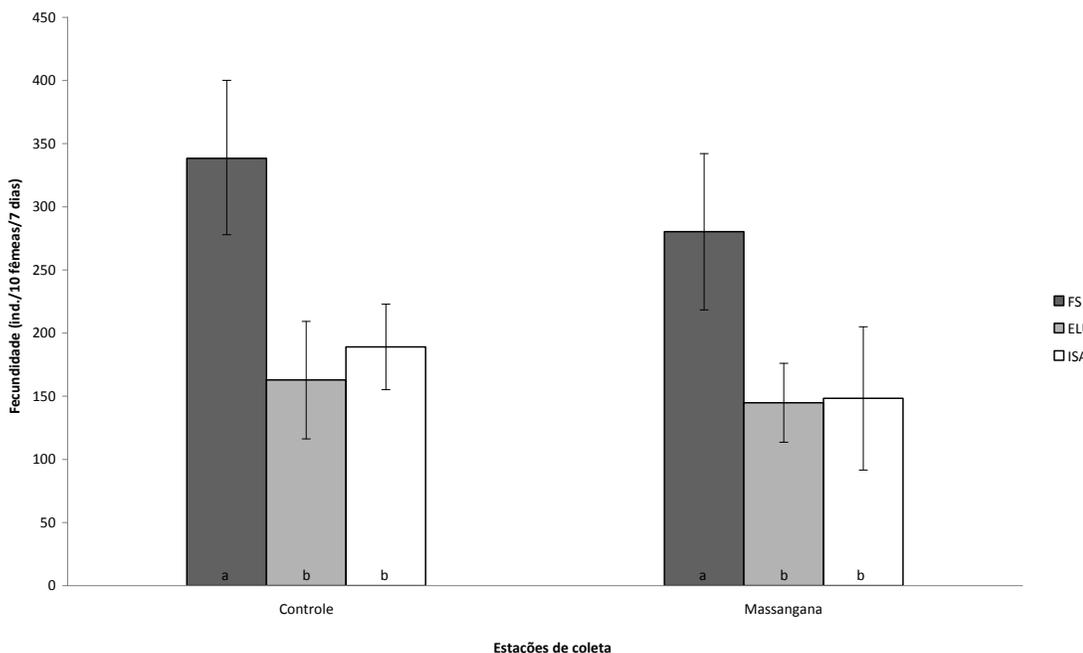


Figura 6. Média (\pm desvio padrão) da fecundidade no experimento de dezembro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as metodologias dentro de cada estação de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

Na estação controle, o teste de Tukey mostrou que a média do número de copepoditos na fecundidade, não foi significativamente diferente entre as metodologias da fase sólida e do elutriato. A metodologia da interface sedimento/água obteve média significativamente mais baixa dentre as metodologias (Figura 7).

Na estação de coleta do rio Massangana, o teste de Tukey mostrou que, diferente da estação controle, não existiram diferenças significativas entre as metodologias da fase sólida e da interface sedimento/água. A metodologia do elutriato obteve média de copepoditos na fecundidade mais alta do que as demais metodologias (figura 7).

O teste de Tukey mostrou que a média do número de copepoditos na estação de coleta do rio Massangana foi mais baixa do que a média da estação controle (metodologia da fase sólida),

evidenciando assim, que o sedimento da estação de coleta do rio Massangana provocou toxicidade subletal em *T. biminiensis* (Figura 7).

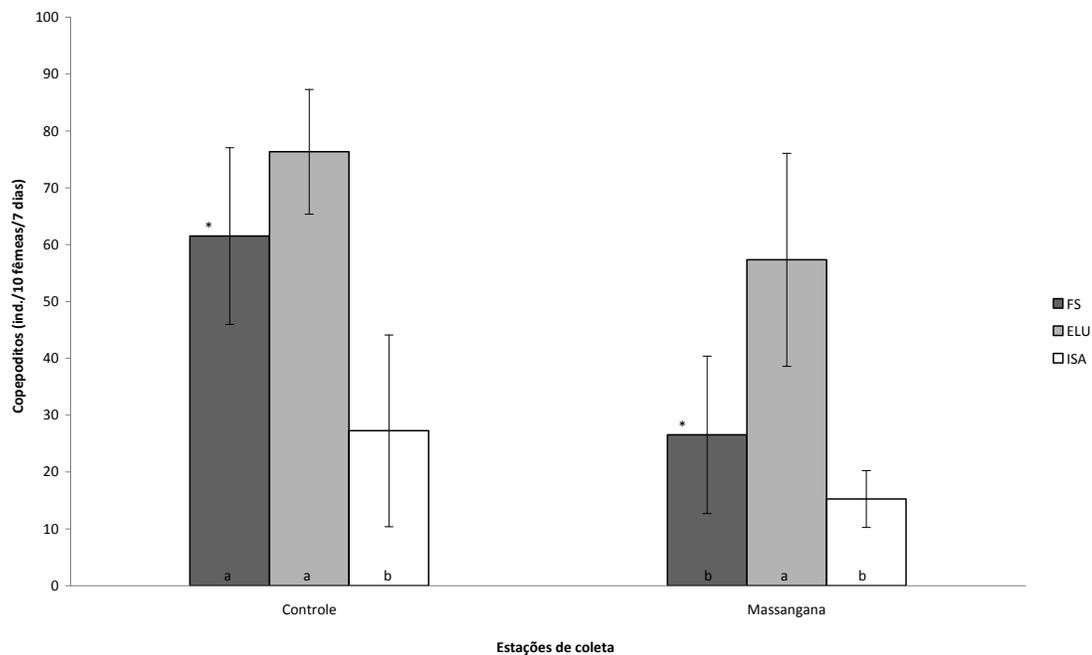


Figura 7. Média (\pm desvio padrão) do número de copepoditos na prole no experimento de dezembro de 2007. a e b = diferenças encontradas pelo teste de Tukey dentro de cada estação de coleta. * = diferenças encontradas pelo teste de Tukey entre as estações de coleta. FS = fase sólida; ELU = elutriato e ISA = interface sedimento/água.

5. DISCUSSÃO

O baixo percentual de formação de pluteus de *L. variegatus*, no presente estudo, pode ter sido consequência de um alto índice de amônia não-ionizada e/ou sulfeto de hidrogênio presentes nos sedimentos da estação controle e da estação teste, já que se tratam de sedimentos de áreas estuarinas onde ocorre intensa oxidação de matéria orgânica pela ação bacteriana (Phillips et al., 1997; Losso et al., 2007; Michaud et al., 2006; Sakamaki et al., 2006; Piedras et al., 2006; Araújo, 2005). De fato, no presente estudo, os valores encontrados para a amônia não-ionizada no elutriato do sedimento controle (0,06 mg/L de N-NH₃) e no elutriato do sedimento do estuário do rio Massangana (> 0,96 mg/L de N-NH₃) (Tabela 1), foram relativamente altos para *L. variegatus*. O elutriato do sedimento de estuário do rio Massangana foi diluído a 10% e, mesmo assim, ainda apresentou uma alta concentração de amônia não-ionizada para *L. variegatus* (0,09 mg/L de N-NH₃). A ABNT (2006) alerta para o fato do desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* ser sensível à amônia não-ionizada. Segundo esta Norma, a concentração de 0,05 mg/L de N-NH₃, isoladamente, pode causar efeito tóxico sobre o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*.

No presente estudo, os efeitos percebidos no desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* nas metodologias do elutriato e da interface sedimento-água, apontam para uma condição tóxica do sedimento utilizado, tanto para o controle quanto para o sedimento da estação de coleta do rio Massangana. Porém, estudos realizados por Araújo-Castro et al. (2009), apontam o sedimento do estuário do rio Maracaípe como uma boa opção para sedimento controle. O estuário do rio Maracaípe representa uma área bem preservada de manguezal, longe de centros urbanos e com uma bacia de drenagem pequena. Seu sedimento (usado como controle no presente estudo) possui uma concentração muito baixa, às vezes indetectável, para a maioria dos metais, além de baixas concentrações de HPA e alifáticos. Ainda segundo Araújo-Castro et al. (2009), o sedimento do estuário do rio Maracaípe, permite uma alta taxa de sobrevivência e fecundidade quando utilizado em bioensaios com *T. biminiensis*. Sendo assim, a concentração de amônia não-ionizada (ou mesmo sulfeto de hidrogênio) pode explicar o baixo desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* para o sedimento utilizado no controle.

No caso do sedimento da estação de coleta do estuário do rio Massangana, apenas a concentração de amônia não-ionizada, encontrada no elutriato, já seria suficiente para causar os

efeitos observados no desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*. Entretanto, Araújo-Castro (2008), testou o sedimento do estuário do rio Massangana em bioensaios toxicológicos, utilizando *T. biminiensis* como organismo-teste, e realizou análises químicas para investigar as concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos deste sedimento. Em seus bioensaios, encontrou efeitos letais e subletais para *T. biminiensis*. Toda via, constatou que (nos anos de 2003, 2005 e 2006) os sedimentos amostrados em estações de coleta localizadas no complexo estuarino de Suape, do qual o estuário do rio Massangana faz parte, as concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos possuíam baixo potencial de causar efeito biológico adverso. Este mesmo autor chama atenção para os níveis de Cd, que podem ocasionalmente provocar efeitos tóxicos em *T. biminiensis*. Seus resultados sugerem que a área do estuário do rio Massangana, assim como todo o complexo estuarino de Suape, vem sofrendo ao longo dos anos uma deposição contínua de poluentes compostos por metais pesados e hidrocarbonetos, oriundos das indústrias, agronegócios, tráfego náutico e cidades que circundam a região.

Desta forma, no presente estudo, os ensaios toxicológicos realizados com *L. variegatus* no sedimento da estação de coleta do rio Massangana, não têm como distinguir com clareza qual composto é o principal responsável pela toxicidade encontrada. Contudo, devido à sensibilidade de *L. variegatus* à amônia e à concentração de amônia não-ionizada encontrada no elutriato do sedimento da estação de coleta do rio Massangana, pode-se sugerir que este composto esteja agindo de forma mais contundente para provocar efeitos tóxicos no desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*, tanto na metodologia do elutriato quanto na da interface sedimento-água.

Entre outros, a amônia é um componente natural dos sedimentos marinhos que, em determinadas regiões, pode existir em concentrações tóxicas para determinados grupos de organismos. Suas concentrações estão ligadas às condições físico-químicas do sedimento e da água sobrejacente (interface sedimento-água), da biota presente e da quantidade de matéria orgânica que está sendo decomposta (processos físicos, químicos e biológicos). Essa matéria orgânica ainda pode ser aumentada nos ecossistemas marinhos pela contribuição antropogênica (efluentes de indústrias e esgotos domésticos; escoamento de águas pluviais e fluviais terrestres; fertilizantes e insumos agrícolas lixiviados pelas chuvas). O excesso de matéria orgânica e as altas concentrações de amônia podem mascarar o efeito e/ou interferir na biodisponibilidade de algumas substâncias, além de provocar falsos positivos, o que pode interferir nos testes

toxicológicos com sedimentos (Piedras et al., 2006; Phillips et al., 1997; Pusceddu et al., 2007; Michaud et al., 2006; Sakamaki et al., 2006; Beiras et al., 2003b; Green et al., 1993; Araújo, 2005; Losso et al., 2007).

Pusceddu et al. (2007), Cesar et al. (2004) e Anderson et al. (2001) também relacionam as concentrações de amônia como uma das principais fontes de toxicidade encontradas em seus estudos. Estes autores, assim como no presente estudo, avaliaram a toxicidade de sedimentos oriundos de áreas portuárias (ou próximas), utilizando as metodologias da interface sedimento-água e do elutriato, juntamente com testes de toxicidade crônica de curta duração, onde o desenvolvimento embriolarval de espécies de ouriço-do-mar foi utilizado como organismo-teste. Os resultados encontrados por estes autores reforçam que o desenvolvimento embriolarval de ouriços-do-mar, tais como as espécies *L. variegatus*, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis* e *Stronglylocentrotus purpuratus*, é sensível à amônia não-ionizada.

McDonald (2005) testou a toxicidade do sedimento de um porto urbano no Canadá, utilizando as metodologias do elutriato e da água intersticial, juntamente com larvas do bivalve *Mytilus galloprovincialis* recém-fertilizadas como organismos-teste. As concentrações de amônia não-ionizada encontradas em suas amostras de referência eram suficientes para não permitir o desenvolvimento normal das larvas de *M. galloprovincialis*. Pela ausência de concentrações elevadas de metais pesados e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), o autor sugere a amônia não-ionizada como o mais provável agente tóxico presente no sedimento examinado.

Phillips et al. (1997) também encontraram altos níveis de amônia não-ionizada e sulfeto de hidrogênio, quando estudavam a distribuição destes compostos na água intersticial e sobrejacente de amostras de sedimento da baía de San Diego e do porto de Los Angeles, na Califórnia, com o Amphipoda marinho *Rhepoxynius abronius* como organismo-teste.

Além dos pontos já discutidos acima (matéria orgânica, concentrações de amônia não-ionizada e sedimentos estuarinos), a metodologia, a fase do sedimento e o organismo-teste a serem utilizados, são outros pontos de suma importância para o sucesso e a precisão dos ensaios toxicológicos.

O elutriato é uma metodologia padronizada e utilizada em diversos estudos toxicológicos (U.S.EPA, 2001; ABNT, 2006; Souza et al., 2007; Geffard et al., 2003; Beiras et al., 2003a e b; Ghirardini et al., 2005; Hyötyläinen & Oikari, 1999; Losso et al., 2007). Os resultados obtidos com a metodologia do elutriato, no presente estudo, sugerem que o revolvimento do sedimento

nas áreas estudadas (dragagens, arrasto de equipamentos, obras para instalação de dutos) pode disponibilizar na água sobrejacente substâncias tóxicas que impedem o desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*. No presente estudo, o elutriato de cada amostra de sedimento foi testado sem ser diluído e, a fase líquida que ele representa, foi a única a ter os níveis de amônia não-ionizada aferidos, e apenas estes foram aferidos, nenhum outro parâmetro químico foi investigado (a não ser os parâmetros físico-químicos apresentados na Tabela 1).

Os resultados encontrados na metodologia da interface sedimento-água sugerem que esta metodologia causa efeitos mais severos ao desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus*. Nesta metodologia, nenhum indivíduo exposto conseguiu chegar ao estágio de larva pluteus nas amostras de sedimento das estações controle e do rio Massangana. Vários estudos citam a interface sedimento-água como uma importante via no intercâmbio e no ciclo de nutrientes com a água sobrejacente, sendo uma localização susceptível à exposição para espécies epibentônicas ou para estágios de vida epibentônicos (Anderson et al., 2001; Sakamaki et al., 2006 e Michaud et al., 2006).

No presente estudo, o sedimento utilizado para os ensaios nesta metodologia não foram homogeneizados, desta forma não perderam sua estratificação. Segundo Anderson et al. (2001) e Sakamaki et al. (2006), a preservação da estratificação não é só importante para o fluxo de contaminantes na interface sedimento-água, mas também para o fluxo e o ciclo dos nutrientes. O sedimento intacto preserva suas características físico-químicas, seus processos e interações biológicas, se sofrerem homogeneização estas características podem ser perdidas ou alteradas. A homogeneização, ou manipulação, do sedimento pode afetar significativamente os resultados dos testes de toxicidade para sedimentos contaminados, principalmente quando são usados sistemas de exposição designados por avaliação toxicológica do fluxo de contaminantes (Anderson et al., 2001).

Segundo Puscedu et al. (2007), a menor manipulação das amostras de sedimento na metodologia da interface sedimento-água, pode favorecer uma melhor preservação das condições naturais do sedimento, promovendo a minimização dos possíveis efeitos causados pelos interferentes presentes em testes com a metodologia do elutriato. A melhor preservação das condições naturais das amostras de sedimento para a metodologia da interface sedimento-água, no presente estudo, pode explicar o efeito observado no desenvolvimento embriolarval de *L. variegatus* em comparação à metodologia do elutriato.

A utilização de organismos planctônicos, ou meroplanctônicos, na avaliação toxicológica de sedimentos, seja através da interface sedimento-água ou do elutriato, deve ocorrer com cautela, pois estes organismos podem apresentar uma maior sensibilidade às condições características do ambiente sedimentar; a exemplo da amônia, substância que apresenta alta toxicidade aos embriões de ouriço-do-mar, tornando importante o conhecimento prévio de suas concentrações. Somado a isto, existem as limitações inerentes às metodologias que realizam a extração da fase líquida dos sedimentos, que podem alterar profundamente as características e a disponibilidade dos contaminantes.

Tendo em vista que a utilização de métodos isolados apresenta certas limitações, o presente estudo utilizou metodologias que pudessem representar mais de uma via de exposição a contaminantes e organismos-teste que pudessem representar grupos de diferentes compartimentos (bentônicos e meroplanctônicos) (Chapman, 2002; Chapman et al., Chapman et al., 2002). Sendo assim, nos ensaios com *T. biminiensis*, além das metodologias já utilizadas nos ensaios com *L. variegatus*, foi utilizada também a metodologia da fase sólida do sedimento.

A metodologia da fase sólida do sedimento (ou sedimento integral) vem sendo utilizada em diversos estudos toxicológicos por permitir a exposição direta dos organismos-teste aos contaminantes presentes no sedimento. Contaminantes que estão diretamente ligados aos sedimentos, principalmente à fração fina ou lamosa dos sedimentos (<63µm), poderão ser avaliados permitindo investigar seus efeitos via contato direto e ingestão. Nem sempre os contaminantes presentes no sedimento vão estar biodisponíveis em sua fração líquida ou na coluna d'água, por este motivo, geralmente, os ensaios toxicológicos que utilizam a fase líquida do sedimento (elutriato, água intersticial ou interface sedimento-água), realizam em paralelo, ensaios com a metodologia da fase sólida do sedimento (Green et al., 1993; Sousa et al., 2007; Geffard et al., 2003; Grant et al., 2002).

Necessariamente, os organismos-teste utilizados nos ensaios com a fase sólida do sedimento, precisam apresentar resistência às condições biológicas e físico-químicas naturais relacionadas a este compartimento, caso contrário eventos naturais poderiam ser confundidos com efeitos tóxicos causados por poluentes (principalmente quando se trata de sedimento estuarino) (Chapman, 2002; Abessa et al., 2006). Segundo Araújo-Castro et al. (2009) e Araújo-Castro (2008), *T. biminiensis* é um organismo-teste promissor em avaliações toxicológicas que utilizem a metodologia da fase sólida do sedimento. Os resultados encontrados por Araújo

(2005), demonstram que *T. biminiensis* possui uma considerável resistência à amônia não-ionizada (CE_{50} de 96 horas de $2,55 \pm 0,69$ mg/L de N-NH₃), podendo assim, evitar falsos positivos de toxicidade relacionados às concentrações de amônia não-ionizada. Desta forma, a concentração de amônia não-ionizada encontrada no elutriato do sedimento do estuário do rio Massangana ($> 0,96$ mg/L de N-NH₃), no presente estudo, provavelmente não é a responsável pelos efeitos subletais observados na fecundidade e no número de copepoditos na prole de *T. biminiensis*. Sendo assim, pode-se sugerir que *T. biminiensis*, por ser uma espécie epibentônica e por passar todo o seu ciclo de vida ligado ao sedimento, tenha maior resistência às condições biológicas e físico-químicas encontradas nos sedimentos estuarinos.

Araújo-Castro (2008) observou efeitos letais (agudos) e subletais (crônicos) para *T. biminiensis* em bioensaios que avaliaram toxicologicamente os sedimentos do estuário do rio Massangana. O autor relaciona os efeitos crônicos à contínua deposição de poluentes oriundos das atividades antrópicas, desenvolvidas no entorno da área, ao longo dos anos. Os resultados observados para o presente estudo vêm corroborar com os resultados encontrados por Araújo-Castro (2008). No presente estudo, foram observados efeitos crônicos para *T. biminiensis* nos dois períodos estudados: em outubro de 2007, a fecundidade e o número de copepoditos na prole foram afetados e em dezembro de 2007, apenas o número de copepoditos na prole foi afetado. Assim como os resultados do presente capítulo, os do primeiro capítulo, também apresentam conformidade com os resultados encontrados por Araújo-Castro (2008), demonstrando que não só o sedimento do estuário do rio Massangana, como também, sua água superficial apresenta vulnerabilidade e risco ambiental. E essa vulnerabilidade tem a tendência de se agravar nos períodos chuvosos, devido aos poluentes que as águas das chuvas carregam para o complexo estuarino de Suape e para os rios que nele deságuam.

Apenas a metodologia da fase sólida apresentou efeitos tóxicos para *T. biminiensis*. As metodologias do elutriato e da interface sedimento-água apenas apresentaram uma tendência a queda, que não foi significativa, na fecundidade e no número de copepoditos na prole para o sedimento da estação de coleta do rio Massangana. Como sugerido anteriormente, *T. biminiensis* apresenta-se bem adaptado às condições naturais do ambiente sedimentar, desta forma, pode-se aceitar que a concentração de amônia não-ionizada, aferida no presente estudo, não influenciou nos resultados observados. Sendo assim, provavelmente os contaminantes responsáveis pelos

efeitos tóxicos crônicos observados na fecundidade e no número de copepoditos na prole de *T. biminiensis*, estejam associados às partículas do sedimento.

Geffard et al. (2003), avaliando a biodisponibilidade e toxicidade de hidrocarbonetos e metais pesados associados ao sedimento, utilizaram as metodologias do sedimento integral, água intersticial e elutriato. De acordo com este autor, a avaliação da toxicidade do sedimento e a biodisponibilidade dos contaminantes foram mais facilmente determinadas utilizando-se a metodologia do sedimento integral (fase sólida). Sousa et al. (2007), avaliando a toxicidade de sedimentos originários do Porto de Santos – SP, Brasil, também encontraram resultados mais severos nos ensaios toxicológicos com o sedimento integral. Como discutido, os resultados do presente estudo também sugerem que, em relação à toxicidade dos sedimentos, a metodologia da fase sólida foi a que forneceu dados mais consistentes sobre o risco tóxico ao qual a biota local está exposta, devido à deposição de poluentes no estuário do rio Massangana.

6. CONCLUSÕES

- O presente estudo obteve resultados que corroboram com a hipótese da amônia não-ionizada ser uma importante fonte, seja natural ou provocada pela ação antrópica, de toxicidade que interfere no resultado final dos ensaios toxicológicos que utilizam o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *L. variegatus* como organismo-teste, podendo exagerando seus resultados ou acusar falsos positivos de toxicidade;
- As metodologias do elutriato e da interface sedimento-água não evidenciaram qualquer efeito tóxico do sedimento testado (seja agudo ou crônico) para *T. biminiensis*. Este fato pode estar atrelado ao tipo de poluente e a qual fração do sedimento ele está relacionado;
- Substâncias tóxicas (a exemplo dos hidrocarbonetos e metais pesados) estão ligadas às partículas finas do sedimento do estuário do rio Massangana (principalmente na fração < 63µm) e outras substâncias, tais como a amônia não-ionizada, podem estar sendo disponibilizadas à água sobrejacente após ação mecânica que promova revolvimento dos sedimentos, ou pelo fluxo de substâncias através da interface sedimento-água sobrejacente;
- Este estudo também demonstra que existem diferenças potenciais nas respostas de toxicidade entre as metodologias e os organismos-teste utilizados nas análises com sedimentos de áreas estuarina, sendo importante a realização de testes toxicológicos que integrem diferentes metodologias e mais de um tipo de organismo-teste, na intenção de avaliar mais de um compartimento do sedimento ou do próprio ecossistema;
- Os resultados corroboram com a hipótese de *T. biminiensis* ser um organismo-teste apropriado a ensaios toxicológicos que utilizem a metodologia da fase sólida do sedimento. E esta foi a metodologia que melhor evidenciou os efeitos tóxicos que os sedimentos do estuário do rio Massangana podem provocar.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABNT (Associação Brasileira de Normas e Técnicas). (2006) **Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração**. Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma técnica NBR 15.350, RJ, ABNT, 17p.
- ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M. & TOMMASI, L. R. (2006) Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia – UFC*, v. 19, No. 2, 253-261pp.
- ANDERSON, B. S.; HUNT, J. W.; PHILLIPS, B. M.; FAIREY, R.; PUCKETT, H. M.; STEPHENSON, M.; TABERSKI, K.; NEWMAN, J. & TJEERDEMA, R. S. (2001) Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Marine Environmental Research*, v. 51, 191-211pp.
- ARAÚJO, R. J. V. (2005) Tolerância do Copepoda *Tisbe biminiensis* à amônia em testes agudos. Monografia de Especialização em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, 24p.
- ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P. (2005) Are the diatoms *Navícula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 327, pp. 58-69.
- ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. (2008) Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos. Tese de Doutorado em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, 104p.
- ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; COSTA, M. F. (2009) Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 57, No. 1, pp. 33-41.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; MICHON, Q.; GARRIGUES, P.; BURGEOT, T.; BELLOCQ, J. (1998) Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 47, pp. 77-90.

- BEIRAS, R.; FERNÁNDEZ, N.; BELLAS, J.; BESADA, V.; GONZÁLEZ-QUIJANO, A.; NUNES, T. (2003a) Integrative assessment of marine pollution in Galician estuarines using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere*, v. 52, pp. 1209-1224.
- BEIRAS, R.; BELLAS, J.; FERNÁNDEZ, N.; LORENZO, J. I.; COBELO-GARCÍA, A. (2003b) Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*, v. 56, pp. 531-553.
- BENGTSSON, B. E. (1978) Use of a Harpacticoid Copepod in Toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, v. 9, pp. 238-241.
- BÖTTGER, S. A.; McCLINTOCK, J. B. (2001) The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Part C129, pp. 307-315.
- 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 Portman Bay. *Scientia Marina*, v. 68, pp. 205-213.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). (1999) **Água do mar: teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)**. Método de ensaio. Norma técnica L 5.250, São Paulo, Cetesb, 22p.
- CHAPMAN, P. M. (2002) Integrating toxicology and ecology: putting “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, pp. 7-15.
- CHAPMAN, P. M.; HO, K. T.; MUNNS Jr., W. R.; SOLOMON, K.; WEINSTEIN, M. P. (2002) Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, pp. 271-278.
- GEFFARD, O.; GEFFARD, A.; HIS, E.; BUDZINSKI, H. (2003) Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine pollution Bulletin*, v. 46, pp. 481-490.

- GHIRARDINI, A. V.; NOVELLI, A. A.; TAGLIAPIETRA, D. (2005) Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environmental International*, v. 31, pp. 1065-1077.
- GRANT, A.; BRIGGS, A. D. (2002) Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts? *Marine Environmental Research*, v. 53, pp. 95-116.
- GREEN, A. S.; CHANDLER, G. T.; BLOOD E. R. (1993) Aqueous-, pore-water-, and sediment-phase cadmium: toxicity relationships for a meiobenthic copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 12, pp. 1497-1506.
- GUILLARD, R.R.L. (1975) Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In SMITH, W. L. e CHANLEY, M. H. (eds), **Culture of Marine Invertebrates Animals**. Plenum Press, N.Y., pp. 26-60.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 18, pp. 2914-2920.
- HYÖTYLÄINEN, T.; OIKARI, A. (1999) The toxicity and concentrations of PHAs in creosote-contaminated lake sediment. *Chemosphere*, v. 38, No. 5, pp. 1135-1144.
- KOBAYASHI, N.; OKAMURA, H. (2004) Effects of heavy metals on sea urchin embryo development.1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, v.55, pp. 1403-1412.
- LIMA, L. C. M.; SOUZA-SANTOS, L. P. (2007) The ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae as a function of *Tisbe biminiensis* copepod concentration. *Aquaculture*, v. 271, pp. 411-419.
- LOSSO, C.; NOVELI, A.A.; PICONE, M.; MARCHETTO, D.; PANTINE, C.; GHETTI, P.F.; GHIRARDINI, A.V. (2007) Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, pp. 252-257.
- McDONALD, B. G. (2005) Comparison of porewater and elutriate bivalve larval development toxicity testing in a sediment quality triad framework. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 62, 383-390pp.

- MICHAUD, E.; DESROSIERS, G.; MERMILLOD-BLONDIN, F.; SUNDBY, B.; STORA, G. (2006) The functional group approach to bioturbation: II. The effects of the *Macoma balthica* community on fluxes of nutrients and dissolved organic carbon across the sediment- water interface. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 337, pp. 178-189.
- MILIOU, H.; VERRIOPOULOS, G.; MAROULIS, D.; BOULOUKOS, D.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. (2000) Influence of Life-History Adaptations on the Fidelity of Laboratory Bioassays for the Impact of Heavy Metals (Co²⁺ and Cr⁶⁺) on Tolerance and Population Dynamics of *Tisbe holothuriae*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, No. 4, pp. 352-359.
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE M. H.; READMAN, J. W.; LEONARD, D. R. P. (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, v. 552, pp. 247-268.
- ONORATI, F.; BIGONGIARI, N.; PELLEGRINI, D.; GIULIANI, S. (1999) The suitability of *Corophium orientale* (Crustácea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, v. 2, pp. 465-473.
- PHILLIPS, B. M.; ANDERSON, B. S.; HUNT, J. W. (1997) Measurement and Distribution of Interstitial and Overlying Water Ammonia and Hydrogen Sulfide in Sediment Toxicity Tests. *Marine Environmental Research*, v. 44, No. 2, pp. 117-126.
- PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F.; MORAES, P. R. R.; CARDOSO, D. F. (2006) Lethal concentration (CL₅₀) of unionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. *Sci. Agric.*, v. 63, No. 2, pp. 184-186.
- 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*, v.198, pp. 253-267.
- PUSCEDDU, F. H.; ALEGRE, G. F.; PEREIRA, C. D. S. & CESAR, A. (2007) Avaliação da toxicidade do sedimento do complexo estuarino de Santos empregando ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, No. 3, pp. 237-242.

- RAISUDDIN, S.; KWOK K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; SCHLENK, D.; LEE, J. S. (2007) The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*, v. 83, pp.161–173.
- SAKAMAKI, T.; NISHIMURA, O.; SUDO, R. (2006) Tidal time-scale variation in nutrient flux across the sediment-water interface and estuarine tidal flat. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 67, pp. 653-663.
- SIKAVUOPIO, S.I.; DALE, T.; FOSS, A.; MORTENSEN, A. (2004) Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, v. 242, pp. 313-320.
- SOUSA, E. C. P. M.; ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; GASPARRO, M. R.; ZAROM, L. P. (2007) Ecotoxicological assessment of sediments from the port of Santos and the disposal sites of dredged material. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, No. 2, pp. 75-81.
- SOUZA, M. M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. (2001) Variação temporal da estrutura dos bosques de mangue de Suape – PE após a construção do porto. *Acta Botânica Brasileira*, v. 15, No. 1, pp. 01-12.
- 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. *Aquaculture Research*, v. 37, pp. 1516-1523.
- THOMAS, K. V.; BARNARD, N.; COLLINS, K.; EGGLETON, J. (2003) Toxicity characterisation of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. *Chemosphere*, v. 53, 1105-1111pp.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency). (2001) **Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: Technical manual.** EPA-823-B-01-002. Washington, USA, 208p.