

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS CECA - UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA



ROMERO CASTRO DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DE ÁGUAS RESIDUAIS E SEDIMENTOS DO
RIO PARAÍBA DO MEIO, VIÇOSA - AL**

VIÇOSA
2022

ROMERO CASTRO DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DE ÁGUAS RESIDUAIS E SEDIMENTOS DO
RIO PARAÍBA DO MEIO, VIÇOSA - AL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus CECA, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barros Correia da Silva

Viçosa

2022

Folha de Aprovação

ROMERO CASTRO DA SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DE ÁGUAS RESIDUAIS E SEDIMENTOS DO RIO PARAÍBA DO MEIO, VIÇOSA - AL

Trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, *Campus CECA*, Unidade Educacional Viçosa e aprovado em 17/02/2022.



Documento assinado digitalmente
Thiago Barros Correia da Silva
Data: 07/03/2022 17:45:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Thiago Barros Correia da Silva
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Danillo de Souza Pimentel
Data: 04/03/2022 12:16:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Prof. Dr. Danillo Souza Pimentel



Documento assinado digitalmente
Marcia Kikuyo Notomi
Data: 04/03/2022 13:44:39-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Profa. Dra. Marcia Kikuyo Notomi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força de vontade para correr atrás do meu sonho.

Aos meus pais Romero Castro da Silva e Ana Patrícia Peixoto Moraes da Silva, e minha irmã Renata Patrícia Moraes da Silva, que são minha base e estiveram sempre comigo apoiando e incentivando a todo momento.

Agradeço ao Professor Thiago Barros Correa da Silva, por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando no projeto de pesquisa durante a graduação e agora no TCC.

À minha namorada que esteve comigo, me deu apoio em Viçosa e me impulsionou sempre a ser melhor.

Agradeço a todos os professores que tiveram um importante papel na minha formação, pegaram no pé e fizeram questão de ensinar.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos que hoje considero irmãos e que foram verdadeiros presentes divino.

RESUMO

A atividade humana vem modificando o ecossistema aquático ao longo dos anos, depositando contaminantes, como componentes tóxicos, nos lençóis de água que podem alcançar as pessoas impactando-as diretamente. Estima-se que no Brasil cerca de 105 milhões de pessoas habitem áreas sob o risco de contrair enfermidades causadas por micro-organismos e derivados tóxicos em água não tratada ou contaminada, potencializando, assim, possíveis anomalias. O rio Paraíba do Meio, fundamental para o desenvolvimento agropecuário e subsistência de inúmeras famílias ribeirinhas está localizado na zona da mata alagoana, no município de Viçosa, no estado de Alagoas, e serve de depósito para resíduos não neutralizados. Neste sentido, o experimento vislumbrou o uso do teste de toxicidade aguda em embriões de Peixes-zebra ou Zebrafish (*Danio rerio*) para avaliar águas residuais e sedimentos oriundos do mesmo. Utilizou-se 30 embriões por concentração teste, mantidos em placas/poços com 2 ml em um total de 05 embriões por poços, incluindo-se cinco concentrações decrescentes e um controle, avaliados a cada 24 horas durante um período total de 96 horas, teste OECD-236/2013. Revelou-se ao teste de embriotoxicidade que ambos os elementos (águas residuais e sedimento) apresentaram bioatividade indicando toxicidade no rio Paraíba do Meio.

Palavras-chave: Embriões, *Danio rerio*, OECD-236/2013.

ABSTRACT

Human activity has been modifying the aquatic ecosystem over the years, depositing contaminants, such as toxic components, into groundwater that can reach people directly impacting them. It is estimated that in Brazil about 105 million people inhabit areas at risk of contracting diseases caused by microorganisms and toxic derivatives in untreated or contaminated water, thus, potentializing possible anomalies. The Paraíba do Meio river, fundamental for the agricultural development and subsistence of countless riverside families in the of the Alagoas Forest, in the municipality of Viçosa, in the state of Alagoas, exposed, to serve as a deposit of non-neutralized waste. In this sense, the project envisioned the use of the test of acute toxicity in embryos of Zebrafish or Zebrafish (*Danio rerio*) to evaluate wastewater and sediments from it. 30 embryos were used per test, packs in plates/wells with 2 ml in a total of 05 embryos per wells, including five crescents and one control, every 24 hours over a total period of 96 hours, OECD-236/2013 test. It was revealed to the embryotoxicity test that both elements of wastewater and sediments showed bioactivity when indicating the toxic river Paraíba do Meio.

Keywords: embryos, *Danio rerio*, OECD-236/2013.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão de Literatura	11
2.1.1 Viçosa- Alagoas.....	11
2.1.2 Águas	12
2.1.3 <i>Danio rerio</i>	14
2.1.4 FET Test 236/2013	15
2.2 Materiais e métodos	16
2.3 Resultados.....	19
2.4 Discussão	21
3. CONCLUSÃO.	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	25

1. INTRODUÇÃO

O uso racional da água será o grande desafio das nações nas próximas décadas. Rios expostos servem de depósito de resíduos, e isso vem modificando as condições ambientais desses locais afetando diretamente os animais que neles habitam ao provocar possíveis alterações físico-química, distúrbios fisiológicos e carrear agentes patogênicos impactando aos humanos que se expõem ao contato ou ingestão de água e/ou consumo de peixes extraídos destes ambientes. No Brasil a cada ano é crescente a poluição dos recursos hídricos, esse crescimento se dá proporcionalmente ao desenvolvimento econômico do país mesmo possuindo uma legislação ambiental ampla e moderna, incentivos fiscais e disponibilidade tecnológica na garantia da preservação dos recursos naturais (JORDÃO; PÊSSOA, 2011).

Os testes de toxicidade crônica de curta duração têm sido bastante utilizados em organismos sensíveis e de diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Estes ensaios buscam avaliar os efeitos de substâncias sobre a fase mais sensível de um organismo, podendo ser mensurados através da taxa de crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos (ZAGATTO, 2006 a).

A seguinte pesquisa traz um estudo ecotoxicológico em modelo experimental zebra-fish que avaliou águas residuais e sedimentos oriundos do rio Paraíba do Meio utilizando-se da espécie *Danio rerio* a qual é o que há de mais moderno em bioindicador ambiental em ambientes aquáticos e que é amplamente utilizado em estudos toxicológicos, FET TEST OECD-236/2013, por ser um organismo teste sensível a diversos agentes químicos mesmo em concentrações mínimas, expondo em diferentes estágios de evolução/formação o grau de impacto e os possíveis efeitos teratogênicos e letais sobre os animais teste (COIMBRA *et al.*, 2015).

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo avaliar embriotoxicidade proveniente de águas residuais e sedimentos oriundos do rio Paraíba do Meio no município de Viçosa – AL.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Revisão de Literatura

2.1.1 Viçosa- Alagoas

Viçosa é um município do estado de Alagoas que está localizada à 86km da capital Maceió (Figura 1). Atualmente estima-se que a população gire em torno de 25.655 pessoas. A área territorial do município é de 367,888 km², Lat.: - 9°22'17" e Long.: -36°14'27" (IBGE, 2021). No município encontra-se o rio Paraíba do meio que, apesar de ser uma importante fonte de subsistência, também é fonte de propagação de enfermidades de caráter hídrico, devido à falta de saneamento básico (NASCIMENTO, 2017).

Figura 1: Município de Viçosa Alagoas

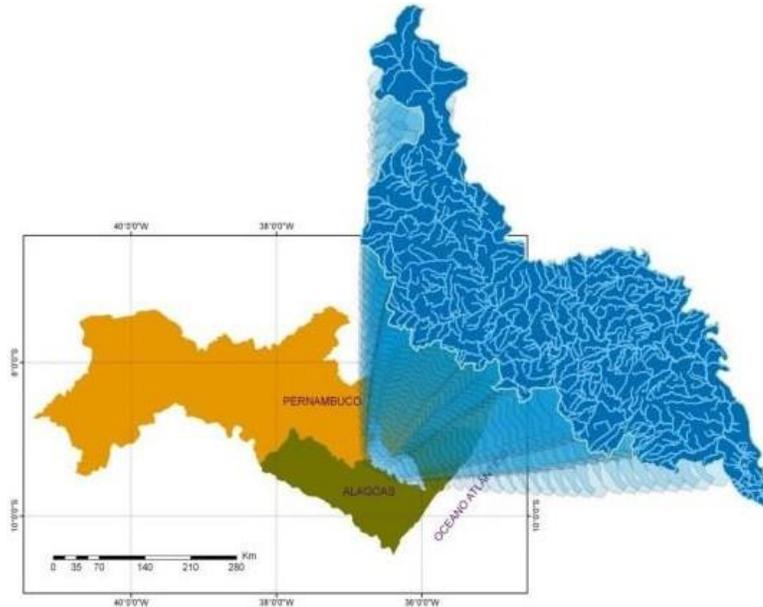


Fonte: Vasconcelos, 2018 disponível em:
<http://drmarcosvasconcelos.blogspot.com/p/vicosa.html>.

A bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Meio está localizada nos estados de Pernambuco e Alagoas, entre 8°45" e 9°30" de latitude sul, e 35°55" e 36°50" de longitude oeste (Figura 2), e possui uma área total de aproximadamente 3.117km² possuindo perímetro de 478 km (Alagoas, 1997). Dentro deste perímetro estão oito municípios do estado de Pernambuco (Bom Conselho, Brejão, Terezinha, Paranatama, Caetés, Garanhuns, Saloá e Lagoa do Ouro) e oito do estado de Alagoas (Quebrangulo, Paulo Jacinto, Viçosa, Palmeira dos índios, Cajueiro,

Capela, Atalaia e Pilar). Ao longo dos seus 171,98 km apresenta 126,57 km de extensão que percorre áreas do Estado de Alagoas com um regime fluvial perene (RAMOS et al., 2017; CUNHA, 1995).

Figura 2. Localização da bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Meio e sua hidrografia



Fonte: Adaptado de Gama et al. (2011)

2.1.2 Águas

A água é composta por diversos elementos que a tornam fundamental para o desenvolvimento das espécies. Estes elementos, quando em equilíbrio, propiciam condições que garantem a pluralidade dos ecossistemas, assim como quando em desequilíbrio podem alterar seus padrões e torna-la intolerável à sobrevivência dos animais presentes no ambiente (PAYNE et al., 2003; EDDY et al., 2016).

As águas transparentes são classificadas como pobres e com poucos nutrientes, enquanto águas turvas diminuem o potencial fotossintético, o que impacta diretamente não só no ambiente, mas também compromete o desempenho fisiológico das espécies. Alguns componentes afetam a qualidade da água impactando na biologia de ecossistemas aquáticos. Dentre estes componentes podemos citar cor, visibilidade, pH, alcalinidade, oxigênio e turbidez (TORREIRO-MELO et al., 2015).

Alguns elementos disponíveis na água necessitam estar em concentrações específicas para que esta não seja considerada tóxica. A amônia, por exemplo, deve estar abaixo de 0,1mg/L e, quando acima do ideal, indica toxicidade devido a excesso de matéria orgânica, excreções, dentre outros. O oxigênio, por sua vez, deve estar em concentrações > 5 mg/L para a manutenção e multiplicação dos organismos aquáticos. Quando entre 0 e 1mg/L é letal e entre 1 e 4mg/L causa estresse retardando, assim, o desenvolvimento dos peixes. Já o pH, é dito como ideal quando entre 7 e 9, enquanto > 11 e < 4 é letal e > 9, < 6 e > 4 provocam estresse nos peixes. A alcalinidade e a dureza serão mensuradas pelos níveis de sais encontrados na água. Os elementos Carbonatos (CaCO) e Bicarbonatos (HCO) quando entre 20 e 300 mg/L são bons valores para a manutenção da vida aquática. A água será caracterizada como mole, ideal ou dura quando houver presença ou ausência do Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) classifica a água como mole, ideal ou dura. Deste modo, quando as concentrações de Ca e Mg estiverem menores que 20mg/L a água será classificada como mole, acima de 201mg/L será dura, e será ideal a níveis de concentração mg/L entre os intervalos mínimo e máximo supracitados (CONAMA, 2005; ABNT, 2016).

Para Nascimento (2017), é necessário haver equilíbrio entre todos os elementos que compõem a água, isto porque o desequilíbrio entre eles pode provocar alterações nos testes, danos aos organismos e gerar incompatibilidade nas análises.

A realização de testes ecotoxicológicos são de suma importância por permitirem a avaliação do efeito e da relação entre dose e tempo de exposição sobre os organismos testados. Além disso, os testes de toxicidade permitem avaliar o grau de sensibilidade ou resistência de animais e plantas a substâncias tóxicas, a um efluente ou mesmo a uma amostra ambiental suspeita de contaminação. Portanto, tais testes estão sendo ferramentas utilizadas no gerenciamento, manejo e monitoração de ambientes aquáticos, assim como para planejar políticas ambientais, cálculos de riscos e servindo como fonte de informação para setores da vigilância e saúde pública (LOURENÇO, 2006).

Os testes de toxicidade crônica de curta duração têm sido bastante utilizados em organismos sensíveis e de diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Estes ensaios buscam avaliar os efeitos de substâncias sobre a fase mais sensível de um organismo, podendo ser mensurados através da taxa de crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos (ZAGATTO, 2006). O uso de organismos em estágios iniciais de vida é recomendado devido ao fato de que organismos jovens são mais sensíveis às substâncias tóxicas (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). “O estágio inicial do desenvolvimento larval se mostra sensível a várias substâncias químicas testadas porque é neste estágio que ocorrem as alterações morfológicas” (JORGE & MOREIRA, 2005).

Os testes toxicológicos são aplicáveis a várias classes de contaminantes, padronizado por Beekhuijzen o “General Morfology Score” (GMS), ou índice morfológico geral (IMG), garantindo uniformidade as análises, estimando concentrações e a duração da exposição que produzem efeitos críticos aos organismos teste (BEEKHUIJZEN, 2015).

2.1.3 *Danio rerio*

O peixe Zebrafish (Figura 3) é originário do Sul da Ásia e foi um dos primeiros invertebrados a serem clonados. A compatibilidade genética com seres humanos é de cerca de 70%. Algumas características como, alta fertilidade, rápida evolução embrionária e 100% do seu código genético decodificado fazem com que tenham um excelente potencial em testes toxicológicos. No Brasil tem sido bastante utilizado como organismo modelo experimental em pesquisas científicas que colaboram com a descoberta, terapêutica e cura de doenças (ENGESZER et al., 2007; SILVA, 2019).

Quando exposta a alterações físicas e químicas do ambiente nos estágios embrionários, a espécie *Danio rerio* demonstra-se bastante sensível, mesmo quando as substâncias teste estão em concentrações baixas. Deste modo, é possível que aconteça alterações em seu desenvolvimento resultando em múltiplos impactos secundários na morfogênese do peixe, alterações cardíacas, redução da mandíbula, lordose ou escoliose e até mesmo sua morte (HELLWEG, 2014).

Figura 3: Peixe Danio rerio.



Fonte: google.com

2.1.4 FET Test 236/2013

O teste FET (Fish Embryo Acute Toxicity Test, nº 236 de 2013), pode ser aplicado em substâncias de diferentes modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade. O teste FET inclui cinco concentrações decrescentes da substância teste e um controle, avaliando-se quatro 'endpoints' apicais registrando ao longo do teste os efeitos lesivos provocados pelo potencial contaminante em cada nível de concentração testada em placas de 24 poços a cada 24 horas dentro de um período de 96 horas. São utilizados 4 indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados; a falta de formação de somito; ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino; e falta de batimentos cardíacos. Após o período de exposição, 96 horas, a toxicidade aguda é determinada com base num resultado positivo em qualquer um dos quatro 'endpoints' apicais e a concentração necessária para produzir a morte de 50% dos indivíduos, a CL_{50} , é calculada (OECD, 2013).

O modelo OECD 236 FET Test, baseia-se na exposição de embriões de peixe zebrafish e avaliação dos parâmetros letais supracitados e subletais que abrangem qualquer alteração que aponte anormalidades no desenvolvimento da espécie, como deformidade de coluna, edema de saco vitelínico, edema pericárdico, ausência de nadadeiras, olhos, boca, mandíbula, pigmentação etc. Dentre indicadores de letalidade estão a coagulação de ovos fertilizados

(apresentam-se opacos, com aspecto leitoso, sendo observados nas primeiras 24 horas de teste); a falta de formação de somito (na espécie *Danio rerio* serão formados e observados ao longo das 24 horas de sua evolução inicial em um embrião de peixe-zebra em desenvolvimento normal, garantindo ao mesmo a mobilidade espontânea); ausência de separação do pedúnculo caudal (é observado com 24 horas de forma parcial ou total); e ausência de batimentos cardíacos (após 48 horas de exposição são visíveis a avaliação por estereomicroscópio, as observações são executadas durante o mínimo de sessenta segundos garantido assim sua presença ou ausência). Avalia-se ainda, eclosão, deformidades de coluna; protrusão da boca, pigmentação da cabeça, corpo e cauda, não desenvolvimento dos olhos, ausência de nadadeira peitoral e circulação sanguínea.

2.2. Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento do presente estudo utilizou-se amostras de águas residuais e sedimento provenientes do rio paraíba do meio localizado na cidade de Viçosa – AL. Todas as amostras foram coletadas em um único momento. Um pool de coletas entre três pontos pré-determinados em setembro de 2020, com as seguintes coordenadas geográficas:

- Ponto 1 (-09°22'46,1" S, -36°15'59,0" O);
- Ponto 2 (-09°22'33,9" S, -36°14'36,6" O);
- Ponto 3 (-09°22'31,1" S, -36°13'55,0" O).

A metodologia aplicada baseou-se nas normativas da OECD 236/2013 a qual padronizam internacionalmente os parâmetros ecotoxicológicos em testes agudos. As amostras foram coletadas manualmente em volumes individuais, 1 litro para águas residuais e 1 kg para sedimento, com auxílio de um balde em triplicata para cada ponto. Todos os frascos utilizados para coleta das amostras foram abertos no momento de sua utilização por tempo necessário para seu preenchimento, acondicionados em caixa isotérmica refrigeradas entre 3 e 10 °C evitando contaminação durante o processo logístico.

Foram utilizados 50 ml de águas residuais diluída em igual proporção de água destilada, após um período de 10 minutos de agitação e 10 minutos de

decantação o sobrenadante foi coletado e este filtrado em papel filtro 50 micras e utilizado o filtrado como solução teste para avaliação teste da toxicidade. Antes de sujeitar o material sedimentar do rio Paraíba do Meio aos bioensaios específicos as amostras foram processadas e estabilizadas por liofilização como descrito por Lydy *et al.* (2004).

Ambas as amostras, águas residuais e sedimento, foram fracionadas em volume/volume e gramas/mililitro respectivamente: 1º fração composta de 100% da amostra teste; 2º fração 75% da amostra teste; 3º fração 50% da amostra teste; 4º fração 25% da amostra teste; 5º fração 1% da amostra teste. Em todas as amostras de águas residuais e sedimento foram adicionadas 0,01% de DMSO incluindo-se o controle negativo (dilúente água destilada). A exposição ao DMSO em concentrações entre 0,00002% a 0,04% não causam toxicidade em embriões de *Danio rerio* segundo, Hallare *et al.*, 2004.

Os peixes foram provenientes de biotério certificado e mantidos segundo os critérios estabelecidos pelo código de ética animal em grupos de cinco animais, um por litro de água, em tanques de 5 L a 27 °C (mantido por meio de condicionador de ar e termostato no sistema de aquários), pH = 6,8 - 7,2 separados por sexo machos e fêmeas, alimentados duas vezes ao dia com uma dieta seca comercial, ao dia anterior à coleta de ovos receberam dieta suplementar de artemia salina (suplemento proteico). Os animais foram mantidos em sistema semifechado com filtros mecânicos, biológicos e de carbono com 100% de troca da água por tanques/dia e aeração, utilizada água filtrada por osmose reversa introduzida na captação do sistema esterilizada por UV (ultravioleta) no sistema de criação biotério certificado pelo CEUA/AL.

Os parâmetros para avaliar a qualidade de água foram monitorados diariamente utilizando colorímetro, avaliou-se os parâmetros amônia, nitrito, nitrato.

Os peixes-zebra são animais foto periódicos em sua reprodução produzindo embriões todas as manhãs, o ciclo dia/noite foi controlado automaticamente por um temporizador sendo 12 horas luz e 12 horas escuro.

Após o período de reprodução foi realizada a sifonagem do fundo do tanque de reprodução para a coleta dos ovos trinta minutos após a cópula. Os ovos não

fertilizados que sofreram injúrias ou apresentaram irregularidades durante o processo de clivagem foram descartados e os embriões viáveis foram mantidos em água tratada com azul de metileno 0,001 mg/L (Sigma, St Louis, MO) e 0,06 g/L de sal (NaCl) mantidos a uma temperatura de 27 °C. Em seguida iniciou-se a execução dos testes.

Ovos do peixe-zebra recém fertilizados foram expostos a solução teste em concentrações decrescentes: 100%, 75%, 50%, 25%, 1% mantendo-se um controle, observando a cada 24 horas no período máximo de 96 horas quatro parâmetros como indicadores de letalidade: (i) coagulação de ovos fertilizados, (ii) falta de formação de somitos, (iii) falta de descolamento do botão de cauda do saco vitelino e (iv) falta de batimentos cardíacos. Ao final do período de exposição a toxicidade aguda foi determinada com base nos resultados positivos das quatro observações apicais e a concentração letal para 50% da população teste, CL_{50} , foi calculada.

Os testes foram replicados em períodos de tempo independentes (Tabela 1), e os embriões não afetados, teratogênicos e mortos foram relatados diariamente durante o período de avaliação.

A análise físico-química das águas residuais foi realizada segundo as diretrizes CONAMA 357/2005. Os métodos estatísticos Probit e Logit foram utilizados para determinar CL_{50} . Os efeitos teratogênicos dos embriões foram avaliados estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste "dunn" com "p ajustado" pelo método "bonferroni" ($P < 0,05$) como teste "pos-hoc".

Tabela 1: Número total de animais utilizados em todas as fases do experimento.

Nº de animais/embriões utilizados no experimento				
Réplicas	1º réplica	2º réplica	3º réplica	TOTAL
Fase A (embriões)	120	120	120	360
TOTAL	120	120	120	360

2.3. Resultados

Para realizar a caracterização físico-química das águas residuais do rio paraíba do meio alguns parâmetros foram avaliados (Tabela 2), entre eles o potencial hidrogeniônico(pH), condutividade elétrica (CE), oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T °C), salinidade (PSS), sólidos totais devolvidos (TDS), potencial de oxidação/redução (ORP), ao mesmo tempo em que se classificou o rio quanto ao nível toxicológico segundo escala relativa adaptada por Bulich (1982), apontando o rio Paraíba do Meio moderadamente tóxico (tabela 3).

Tabela 2. Análise físico-química das águas residuais rio paraíba do meio Viçosa – AL.

PONTOS	pH	CE	OD	T °C	PSS	TDS	ORP
P1	8,31	504,37*	8,47	30,26	0,24	322,78	163,73*
P2	7,51	573,28*	5,63*	32,75	0,27	366,88	138,53*
P3	8,39	495,01*	1,80*	31,64	0,23	316,79	34,06*
C 357	<11;> 7	< 100µS/cm	>6 mg/L	27 °C	<0,5%	< 500 mg/L	> 250 Mv

P1: ponto de análise 1; P2: ponto de análise 2; P3 ponto de análise 3; *alterações nos parâmetros físicoquímicos da água; potencial hidrogênio (pH), condutividade elétrica (CE), oxigênio dissolvido (OD), temperatura em graus celsius (T °C), salinidade (PSS), sólidos totais devolvidos (TDS), potencial de oxidação/redução (ORP); > maior; < menor; µS/cm: microsimens/centímetros; mg/L: miligramas/litro; mV: milivolts. C357: Conselho Nacional do Meio Ambiente -CONAMA 357/2005.

Tabela 3: Sistema de classificação da toxicidade aguda adaptado por Bulich (1982).

CL ₅₀ (% v/v)	CLASSIFICAÇÃO
< 25	Extremamente Tóxico
25 – 50	Altamente Tóxico
51 – 75	Moderadamente Tóxico
> 75	Levemente Tóxico

CL₅₀: Concentração letal para 50% da população teste; < menor que; > maior que; v/v: volume/volume.

Os *endpoints* letais avaliados para águas residuais em p1; p2 e p3 entre as diferentes concentrações testadas não apontaram letalidade maior que 50% aos embriões teste, assim não sendo possível calcular a CL₅₀ para águas residuais.

Entre os quatro parâmetros letais avaliados para sedimento em p1; p2 e p3 as concentrações teste apresentaram letalidade maior que 50% nos embriões da espécie *Danio rerio*, indicando a concentração letal para 50% da população, CL₅₀ (gráfico 1).

A CL₅₀-96 h para os embriões expostos ao sedimento foi calculada para as amostras p1; p2 e p3 (tabela 4), apresentando a CL₅₀ 138,16 mg; 137,96 mg e 147,98 mg/ml receptivamente ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle.

Tabela 4: CL₅₀ do sedimento oriundo do rio paraíba do meio em Viçosa – AL para exposição aguda em embriões do *Danio rerio*.

Substrato	Ponto	CL	Concentração mg/L	Limite Inferior	Limite Superior	χ^2 (qui-quadrado)	P -valor	GL
Sedimento mg/ml	P1	0,5	138,16	110,92	171,05	20,27	0,034268	22
	P2	0,5	137,96	105,28	170,64	40,16	0,018729	22
	P3	0,5	147,98	110,92	185,04	40,62	0,018361	22

P1: ponto de coleta 1; P2: ponto de coleta 2; P3: ponto de coleta 3; mg: miligramas; ml: mililitros; CL: concentração letal; GL: graus de liberdade.

2.4 Discussão

Alterações nos parâmetros do potencial hidrogeniônico indicam anormalidades entre outros elementos que compõem a água e esse desequilíbrio acidobásico pode ser letal aos peixes. Dentre os pontos avaliados ficou demonstrado que o potencial hidrogênio (pH), se apresentou dentro da normalidade a qual determina a Legislação Ambiental 357/2005.

A condutividade elétrica da água é parâmetro indicador de qualidade de água– IQA e a níveis acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indica ambientes contaminados.

Entre os pontos de avaliação o oxigênio dissolvido na água apontou resultados distintos, o ponto um (P1) indicadores dentro dos padrões, o ponto dois (P2) níveis limitantes ao ambiente e o ponto três (P3) concentrações intoleráveis a vida dos peixes que a habitam a CONAMA 357/2005. Temperaturas elevadas proporcionam menor disponibilidade de oxigênio dissolvido na água. É o parâmetro abiótico mais importante, pois a cada um (01) grau Célsius ($^{\circ}\text{C}$) de alteração no ambiente/água em média acarreta 10% de alterações fisiológicas no peixe segundo Chen *et al.* (2016).

A salinidade da água testada ficou dentro da normalidade com resultados inferiores a 0,5% segundo os parâmetros que caracterizam águas doces. Similar aos parâmetros indicados aos sólidos totais dissolvidos ao qual ambas as amostras se mantiveram abaixo do limite determinado pela Legislação Ambiental 357/2005. Os parâmetros do potencial de oxidação/redução se mantiveram fora dos padrões indicando contaminação nos pontos avaliados. A Legislação Ambiental 357/2005 não determina parâmetros específicos para o potencial de oxidação/redução em água doce. Segundo Trevor (2009), o tempo de morte da bactéria E. Coli na água depende do valor de ORP, e segundo Raptis *et al.* (2014) águas que apresentem valores menores que 200mV apontam indícios de contaminação. ORP é um parâmetro microbiológico bastante utilizado por ETA no controle de qualidade das águas de uso humano.

O rio Paraíba do meio foi classificado segundo a escala relativa adaptada por Bulich (1982), em moderadamente tóxico, apresentando bioatividade em concentrações acima de 50% (v/v). Os parâmetros morfológicos registrados nas águas residuais aos embriões de *Danio rerio* avaliados apontaram atraso de eclosão, deformidade de coluna e ausência de batimentos cardíacos indicando bioatividade nas amostras analisadas. Trabalhos anteriores evidenciaram a sensibilidade de embriões a diversos contaminantes químicos incluindo metais pesados segundo Incardona *et al.* (2004); Jezierska *et al.* (2009); Seiler *et al.* (2014). O rio Paraíba do Meio tem a suas margens os maiores assentamentos agrícolas do município e a cidade de Viçosa Alagoas depende economicamente da agropecuária com o modelo de produção agroindustrial potencializando possíveis lixiviados agrícolas que possam acarretar danos ao meio ambiente.

Segundo os protocolos estabelecidos pela OECD 236/2013 para sedimento em P1, P2 e P3 as concentrações apontaram letalidade aos embriões da espécie *Danio rerio* indicando a concentração letal para 50% da população, CL₅₀. Segundo Ansari and Ansari (2015) o estágio larval do peixe zebra-fish pode ser mais sensível comparado com o estágio embrionário quando expostos a compostos como fertilizantes químicos, glifosato, cobre, cádmio, fenol e zinco potencialmente letais as larvas do *Danio rerio*, assim aos testes realizados foi identificada pós eclosão extrema sensibilidade das larvas expostas, sugerindo possíveis contaminantes presentes nas amostras coletadas.

Os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes Zebrafish são particularmente vulneráveis aos efeitos nocivos dos contaminantes químicos, sendo os embriões do peixe altamente sensíveis a derivados petrogênicos, organofosforados e carbonatos amplamente utilizados no controle de pragas no cultivo agrícola e persistentes ao meio ambiente tendo efeitos teratogênico e bioacumulativo em peixes quando carregados por irrigação ou períodos chuvosos as águas superficiais dos rios segundo McIntyre *et al.* (2014).

O rio Paraíba do Meio desde o ano de 2011 é exposto a balsas/dragas dentre o território do município de Viçosa Alagoas executando extração de areia acarretando assoreamento, desmatamento das margens e lançando possíveis contaminantes as suas águas superficiais impactando diretamente o meio aquático e seu ecossistema.

Entre as atividades agrícolas desenvolvidas no município supracitado o uso de substâncias químicas potencialmente tóxicas ao meio ambiente potencializou os possíveis danos gerados aos embriões do *Danio rerio* impactando-os em seu desenvolvimento normal, alterando a biologia e o ecossistema natural da região estudada.

A toxicidade observada nos parâmetros avaliados entre os pontos de coleta pode estar relacionada à distribuição das fontes poluidoras ao longo do rio segundo Oliveira *et al.* (2014). De acordo com Fenili (2011); Araghi *et al.* (2014) existe uma correlação entre as frações granulométricas finas e alguns contaminantes, como os metais que incorporam as porções de areia, silte e argila. Resende *et al.* (2016) corroborou com estudo sobre o rio Capibaribe em que atribui a diferença de toxicidade entre os pontos de coleta às influências fluviais e à heterogeneidade do sedimento da região.

Viçosa – AL não possui um plano de desenvolvimento rural sustentável – PDRS e dentre ele um plano de revitalização da bacia hidrográfica do município mesmo o rio Paraíba do Meio mostrando-se a cada dia mais importante para o desenvolvimento do município. É necessária a implantação do mesmo acima citado monitorando sob a Legislação Ambiental 357/2005 as ações de extrativistas executadas ao longo do leito do rio e o controle ao usar agrotóxicos no desenvolvimento das atividades agrícolas, assim atenuando os impactos ambientais ao mesmo.

Parcerias público-privada podem corroborar na revitalização do rio, assim como parcerias com órgãos e instituições no desenvolvimento de pesquisas e ações extensionistas que colaborem com a diminuição das ações antrópicas ao qual o rio é exposto.

3. CONCLUSÃO

O teste FET em peixe-zebra possibilitou a verificação e a capacidade de sustentação à vida das espécies aquáticas amostras de água tomadas em diferentes pontos ao longo do rio Paraíba do Meio em Viçosa-AL. O ponto três (P3) mostra uma preservação limitante, chegando-se nesta informação devido aos testes morfológicos e físico-químicos realizados, sendo nítido diante ao exposto que a qualidade de água do rio depende do local de coleta e possivelmente da época do ano. Os testes de embriotoxicidade e físico-químicos nas águas residuais e sedimento oriundos do rio paraíba do meio em Viçosa – AL, também permitiu evidenciar toxicidade moderada no rio. Essa observação se baseia principalmente no teste toxicológico realizado, outros estudos deverão ser realizados com a finalidade de obter outros parâmetros com coletas de águas em meses diferentes do ano para analisar períodos de cheia e seca do rio. A toxicidade observada nos parâmetros avaliados entre os pontos de coleta está relacionada com o número de fontes poluidoras ao longo do rio, e por isso houve resultados distintos entre os pontos. Destarte, é urgente o estabelecimento de um programa ambiental para minimizar os efeitos deletérios a qual o rio é submetido.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). Atlas Brasil. Esgotos: despoluição de bacias hidrográficas. Brasília: ANA, 2017. 88 p. Disponível em: http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficas-ResumoExecutivo_livro.pdf. Acesso em 16 jul. 2020.

ALAGOAS. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado de Alagoas. Plano diretor de recursos hídricos das bacias dos rios Paraíba, Sumaúma e Remédios. Alagoas, 1997. 69 p.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos/SP: RiMa, 2006.

ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB), 2015.

ARAGHI, P.E.; BASTAMI, K.D.; RAHMANPOOR, S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments of Gorgan Bay, Caspian Sea. *Mar. Poll. Bull.*, v.89, p.494–498, 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Capítulo 1, 13 de maio de 2011, p.89.

BEEKHUIJZEN, M. et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, v. 56, p. 64-76, 2015. ISSN 08906238 (ISSN).

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic

samples. *Process Biochemistry*. p. 45-47, 1982.
CHEN, T. H.; CHOU, S. M.; TANG, C. H.; CHEN, C. Y.; MENG, P. J.; KO, F. C.;

CHENG, J. O. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, Sexual behavior, And gene expression in the brackish medaka *Oryzias melastigma*. *Chemosphere*, v. 150, p. 566–575, 2016.

COIMBRA, C.D.; CARVALHO, G.; PHILIPPINI, H.; SILVA, M.F.M.; NEIVA, E. Determinação da concentração de metais traço em sedimentos do estuário do rio Maracaípe –Pe/Brasil. *Bra. J. Aquatic. Sci. Tech.*, v.19, p.58-75, 2015.

CONCEA. Resolução CONCEA no 44, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal RESOLUÇÃO NORMATIVA No 44, 1 ago. 2019.

CUNHA, S. B. da. Geomorfologia fluvial. In: GUERRA, A, J, T.; (Org.). *Geomorfologia: uma atualização de bases e conceitos 2. ed.* Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995. p. 45-50.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. *ZEBRAFISH*, 2007.

FENILI, L.H.; GOMES, C.C.; ROCHA, V.F.; ZANIN, G.R. Avaliação da concentração de metais e arsênio e sua relação com granulometria e ensaios ecotoxicológicos no canal do porto de Santos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 5., 2011. Santos, São Paulo.

RAPTIS, C. E.; JURASKE, R.; HELLWEG, S. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. *Water Research*, v. 66, p. 180–189, 2014.

HALLARE, A.v.; KÖHLER, H.-r.; TRIEBSKORN, R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* [s.l.], v. 56, n. 7, p.659-666, ago. 2004. Elsevier BV.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa dos municípios brasileiros, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa dos municípios brasileiros, 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/vicosa/historico>. Acesso em 25 de janeiro de 2021.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004/4/152004.

JEZIERSKA, B.; ŁUGOWSKA, K.; WITESKA, M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009. ISSN 09201742 (ISSN).

JORDÃO, E. D.; PESSÔA, C. A. Tratamento de esgotos domésticos. 6. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2011. 1050p.

JORGE, R. A. D. L. V. C.; MOREIRA, G. S. Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity testes with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 280 – 285, 2005.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos/ SP: RiMa, 2006.

LYDY, M. J.; YOU, J.; WESTON, D. P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 47, 141.

MCINTYRE, J. K. et al. Zebrafish and clean water technology: Assessing soil bioretention as a protective treatment for toxic urban runoff. *Science of The Total Environment*, v. 500–501, p. 173-180, 12/1/ 2014. ISSN 0048-9697.

METCALF, E.; EDDY, H, P, I. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2016. 1980p.

NASCIMENTO, J. S. Indicadores de insalubridade ambiental no município de Viçosa Alagoas. AL. Viçosa, set. 2017. 40p. Universidade Federal de Alagoas.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. [s.l.] OECD, 2013.

OLIVEIRA, T.S.; BARCELLOS, R.O.L.; SCHETTINI, C.S.A.F. CAMARGO, P.B. Processo sedimentar atual e distribuição da matéria orgânica e um complexo estuarino tropical, Recife, PE, Brasil. *Rev. Gestão Cost. Integr.*, v.14, p.399-411, 2014.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; COLLIER, T. K. Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. In: DOUBEN, P. E. T. (Ed.). PAHs: an ecotoxicological perspective England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. p.191-224.

RAMOS, Renilson Pinto da Silva; DEUS, Rodolfo Alexandre da Silva Gomes de; ALEXANDRE, Fernando da Silva; GOMES, Daniel Dantas Moreira. Morfometria da Bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Meio por meio de Técnicas de Geoprocessamento. Revista Brasileira de Iniciação Científica, Itapetininga, v. 4, n. 8, p. 226-246, dez. 2017.

RAPTIS, C. E.; JURASKE, R.; HELLWEG, S. Investigating the relationship between toxicity and organic sum-parameters in kraft mill effluents. Water Research, v. 66, p. 180–189, 2014.

RESENDE, J.S.S.; CRAVEIRO, N.J.A.; PEREIRA, R. Análise granulométrica e do teor de matéria orgânica em sedimentos do estuário do rio Capibaribe – Pe. Est. Geo., v. 26, p. 34-45, 2016.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; SILVA, N. P. C.; SANTOS, A. R.; ANDRADE, A. L. C.; SOUZA, E. H. L. S.; SALES CADENA, M. R.; SÁ, F. B.; SILVA JUNIOR, V. A.; CADENA, P. G. The complexation of steroid hormones intocyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, v. 214, p. 330–340, 2019.

SEILER, T.-B. et al. PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. Chemosphere, v. 112, p. 77-84, 10// 2014. ISSN 0045-6535.

SOUSA, E. C. P. M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002.

TORREIRO-MELO, A. G. A. G. Biomarcadores Ecotoxicológicos em *Poecilia vivipara* para o Monitoramento de Ecossistemas Aquáticos. 2015. 118 Universidade Federal de Pernambuco Recife -PE.

TREVOR V. SUSLOW. Oxidation-Reduction Potential (ORP) for Water Disinfection Monitoring, Control, and Documentation. UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Division of Agriculture and Natural Resources. 2009. p. 2

VASCONCELOS. J.M. Imagens históricas do município de Viçosa Alagoas.
Disponível em: <http://drmarcosvasconcelos.blogspot.com/p/vicosa.html>.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.
Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos/SP: RiMa, 2006 (a).