

IMPLANTAÇÃO DE UM CULTIVO DE *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA): UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA AQUÁTICA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

Sarah Costa Damasceno (*), Jade Lorena Nascimento Teixeira, Marcela Karoline Macedo Alves do Nascimento, Sinara Cybelle Turíbio e Silva Nicodemo

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), damasceno_sarah@yahoo.com.br

RESUMO

Os corpos d'água apresentam indiscutível importância para a vida. Todavia, um grande contingente de poluentes vem sendo efundidos nos ecossistemas aquáticos, causando impactos ecotoxicológicos às populações aquáticas. Com isso, acentua-se a necessidade de ferramentas para análise da qualidade da água, e uma delas é o ramo da ecotoxicologia aquática, a qual detecta ação conjunta de xenobióticos. Os organismos da família Daphnidae são comumente utilizados em testes de toxicidade e o cuidado com a temperatura, qualidade e quantidade alimentar e ambiente físico é primordial para resultados confiáveis. Neste contexto, a definição da faixa de sensibilidade de *C. silvestrii* frente ao cloreto de sódio (NaCl) é fundamental. Assim, o trabalho objetiva implantar um cultivo de *Ceriodaphnia silvestrii* e mantê-lo em boas condições para validá-lo por carta-controle e torná-lo mais uma ferramenta para avaliação ecotoxicológica no Rio Grande do Norte, sob orientação da NBR 13373 de 2005. Os organismos têm sido cultivados com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo com 16 horas de claro e alimentação diária. Semanalmente, todos os aquários são renovados e se a mortalidade é superior a 20% ou organismos com mais de 21 dias é descartado. A água de diluição utilizada é coletada na Lagoa de Jundiá, é filtrada e tem dureza e pH medidos para apresentar resultados entre 40mg CaCO₃ e 48mg CaCO₃/L e de 7,0 a 7,6. Nos testes, cada um dos fatores de diluição deve possuir 10 réplicas para 15ml da solução. Quando 60% ou mais das fêmeas adultas do controle tiverem produzido no mínimo 15 organismos jovens, o ensaio termina. Os resultados são expressos em CENO, CEO, VC e CI. Expecta-se que os organismos consigam sobreviver e manter boa reprodutibilidade em condições adequadas; que a água apresente temperatura média, dureza e pH dentro dos padrões e outras condições ideais para a realização dos testes de sensibilidade. Até o momento, tem-se no uma média de temperatura de 24,1°C e, pH com média de 7,0128 e a natalidade por aquário permanece favorável. Quanto aos testes, espera-se que possuam valor médio, desvio padrão e quociente de variação com variação na ordem de ± 2 , para elaborar uma carta controle do cultivo. Portanto, para garantir a potabilidade da água, a execução do projeto configura-se como auxiliar ao desenvolvimento de outros estudos sobre gestão integrada de disposição e tratamento de efluentes tóxicos em ambientes aquáticos e seus efeitos.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia aquática, *Ceriodaphnia silvestrii*, testes de sensibilidade.

INTRODUÇÃO

Os corpos de água apresentam indiscutível importância para a manutenção da vida no planeta. Todavia, mesmo com a dependência desse recurso essencial e limitado, a intervenção antrópica, desde o processo de sedentarização humana, seguido pelas posteriores revoluções industriais, as quais agravaram os níveis de poluição, até os presentes dias, vem prejudicando a qualidade das águas, sejam elas superficiais ou subterrâneas. Infelizmente, um grande contingente de poluentes diversos lançados no ambiente são efundidos nos ecossistemas aquáticos, de modo temporário ou como forma de disposição final de resíduos.

Essa disposição de substâncias orgânicas e inorgânicas acarreta inúmeros efeitos nocivos à fauna e flora de regiões próximas ou influenciadas pelo corpo hídrico comprometido; a título de elucidação tem-se os riscos à saúde humana e demais seres vivos presentes nos ecossistemas danificados, além de alterações da qualidade da água, de forma a restringir sua utilização na agricultura, no consumo humano e nas atividades econômicas diversas. (Meybec & Helmer, 1992 apud Coelho, 2008).

Destarte, acentua-se a necessidade da utilização de ferramentas que permitam a análise da qualidade da água, a fim de garantir seu aproveitamento para fins econômicos e para consumo humano, além da conservação dos mananciais e dos ecossistemas neles contidos. Uma grande ferramenta para tal são os estudos ecotoxicológicos aquáticos, os quais, ao invés de apenas identificar os agentes tóxicos isoladamente, detectam a ação desses em

conjunto, perante os organismos vivos de um corpo receptor de efluentes (CETESB, 1996 apud CEZAR; DA SILVA; SANTOS, 1997).

O termo Ecotoxicologia deriva da junção das palavras *ecologia*, a qual estuda a relação entre os seres vivos e o meio, e *toxicologia*, que se ocupa em averiguar a ação nociva de substâncias em um organismo, segundo Zagatto & Bertolotti (2006 apud Pompêo et al, 2015). Este conceito foi utilizado pela primeira vez em 1969 por René Truhaut, o qual o define como sendo a ciência que estuda os efeitos de contaminantes sobre populações, comunidades ou ecossistemas animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, de modo integrado (Truhaut, 1997 apud Magalhães; Filho, 2008). Tal vocábulo também pode ser concebido como a disciplina cujo o objetivo é analisar as diferentes formas de poluição do ambiente, oriundas de atividades humanas, e suas consequências sobre os agrupamentos de indivíduos residentes na biosfera, conforme discorre, no primeiro livro publicado sobre o assunto, Ramade (1997 apud Magalhães; Filho, 2008).

Por volta de 1980, órgãos ambientais ao redor do mundo começam a desenvolver protocolos padrão para a utilização de organismos aquáticos em testes de toxicidade, tais como a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) e a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), em conformidade com Magalhães & Filho (2008). No Brasil, ainda segundo os autores acima, os primeiros ensaios ecotoxicológicos tiveram início em 1975 com Programa Internacional de Padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, promovido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standardization (ISO) com a presença da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

Ainda no Brasil, apenas com a Resolução CONAMA 357/2005 – que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes – a integração entre análises ecotoxicológicas e físico-químicas passou a ser discutida de maneira mais ampla. Os testes ecotoxicológicos passaram, então, a serem expressivamente indicados como método de avaliação da qualidade de corpos hídricos e efluentes. Antes da referida resolução, alguns estados brasileiros já incluíam os testes ecotoxicológicos em suas próprias regulamentações, como em São Paulo e em Santa Catarina (Resolução SMA-03/200 e Portaria nº 017/02- FATMA, respectivamente). Outros estados adotaram testes ecotoxicológicos como ferramenta reguladora após o surgimento da Resolução CONAMA, como o Paraná (Portaria IAP nº19/2006). No entanto, no Estado do Rio Grande do Norte ainda não há critérios de toxicidade para o lançamento de efluentes industriais em corpos d'água receptores. São poucos os trabalhos nesta área (Castro, 2008); portanto, torna-se urgente e de relevante importância a realização de estudos que avaliem a toxicidade potencial desses efluentes.

Atualmente, dispomos de diversas normas regulamentando ensaios ecotoxicológicos que realizem essa avaliação com algas, crustáceos e peixes tais como a NBR 13.373, que discorre sobre os testes com *Ceriodaphnia silvestrii*. Por apresentar fácil cultivo, pequeno porte, importância ecológica e ciclo de vida curto, em geral, os organismos da família Daphnidae são preferencialmente utilizados (Rand; 1995 apud Coelho; 2018). No entanto, o cuidado com a temperatura, qualidade e quantidade alimentar e ambiente físico é primordial, porquanto tais fatores ambientais controlam o crescimento e a reprodução do zooplâncton, apesar da pouca informação sobre tal influência sobre traços de vida da *C. silvestrii*. Sem tais preocupações o cultivo não estaria em boas condições para teste, implicando na alteração dos resultados, como ponderam Vijverberg e Fonseca (1998) apud FONSECA & ROCHA (2014). De acordo com a ABNT (2004a) apud Rodrigues (2005), é necessário que o cultivo bem como a manutenção dos organismos-testes escolhidos ocorra de maneira adequada para que os resultados obtidos nos testes realizados possam ser confiáveis.

Dessa forma, mediante monitoramento a partir de recomendações especializadas e confiáveis, há menor possibilidade de interferência no resultado por motivos de saúde dos organismos utilizados, por exemplo. Neste contexto, a definição da faixa de sensibilidade de *C. silvestrii* frente a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) é de fundamental importância no controle de qualidade dos testes realizados. Assim, evita-se que os resultados de futuros testes com a espécie supracitada sejam mascarados devido a problemas no cultivo, ou no procedimento de montagem dos testes.

OBJETIVO

Implantar um cultivo da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* (cladocera, crustacea) e mantê-lo em boas condições de vida, visando validá-lo por carta-controle, tornando-o mais uma ferramenta para avaliação ecotoxicológica no Estado do Rio Grande do Norte, como organismo-teste em ensaios toxicológicos crônicos e agudos, sob orientação da NBR 13373 de 2005.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO

Os organismos têm sido cultivados segundo orientações da NBR 13373/2005, que trata de Ecotoxicologia aquática, Toxicidade crônica e Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). A temperatura do cultivo é controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), bem como seu fotoperíodo (16 horas de claro, com luminosidade difusa) e a alimentação é fornecida diariamente - uma vez ao dia - com ração para peixe e suplementada com vitaminas, uma vez por semana.

Semanalmente, é também realizada a renovação da água de todos aquários, momento em que os organismos são transferidos para um novo aquário. Aqueles aquários que possuem mortalidade superior a 20% são descartados, assim como os organismos com idade superior a 21 dias. A água de diluição utilizada é coletada na Lagoa de Jundiaí, localizada no município de Macaíba/RN. Após a coleta, a água é filtrada à vácuo com membrana filtrante de $0,45\mu\text{m}$ e permanece aerando por, no mínimo, 24 horas antes de ser utilizada. Além disso, a dureza total e o pH são verificados, devendo apresentar, respectivamente, resultados entre 40mg CaCO_3 e 48mg CaCO_3/L e de 7,0 a 7,6.

TESTES DE SENSIBILIDADE

Para ensaios de sensibilidade com *Ceriodaphnia silvestrii*, a NBR 13373/2005 estabelece os requisitos a serem seguidos, a fim de garantir a eficiência dos testes, discorrendo sobre parâmetros físico-químicos, de manipulação, qualidade dos organismos e expressão dos resultados.

Na verificação da sensibilidade dos organismos, faz-se necessária a utilização de uma substância de referência, com a qual devem ser preparadas 5 soluções diferentes, com razão de diluição de 1,2 a 2, em água de diluição com pH entre 7,0 e 7,6 e dureza total entre 40 mg CaCO_3/L e 48 mg CaCO_3/L , como exigido pelo organismo em questão.

A substância de referência escolhida foi o cloreto de sódio, por atender aos critérios descritos por Environmental Canada (1990, apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), tais como ser um contaminante ambiental, de fácil análise química, estar disponível no mercado, ser solúvel em água, ter dados ecotoxicológicos disponíveis, entre outros. Apesar de apresentar toxicidade seletiva para alguns organismos e não funcionar para organismos marinhos, o cloreto de sódio mostrou compatibilidade considerável com a espécie *Ceriodaphnia* spp., manifestando um coeficiente de variação, de apenas 9,4%, nos ensaios realizados no Brasil, de acordo com Buratini-Mendes (2002, apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Cada um dos fatores de diluição deve possuir 10 réplicas em recipientes transparentes de 30ml, onde são depositadas 15ml da solução. Além disso, deve-se manter outros 10 frascos de 30 ml para controle, nas mesmas condições dos demais. Em seguida, com uma pipeta, coloca-se 1 organismo com idade de 6h a 24h em cada recipiente, tomando-se o cuidado de liberá-lo dentro do líquido, a fim de evitar a entrada de ar em sua carapaça e consequente flutuação.

Durante o ensaio, alguns requisitos precisam ser seguidos, como: temperatura entre 23° e 27° , fotoperíodo de 16h com luminosidade difusa, valores Oxigênio Dissolvido inferiores a 3,0 mg/L e pH entre 5,0 e 9,0. Ademais, os organismos precisam ser nutridos diariamente com alimento a base de ração de peixe.

Por se tratar de um ensaio semi-estático, a solução deve ser renovada 2 vezes durante sua realização, em um intervalo de 2 a 3 dias. Nessas circunstâncias, os organismos adultos são transferidos para um novo frasco já com alimento, registrando-se o número de adultos e de jovens sobreviventes. Outrossim, deve-se determinar os valores de OD e pH no controle e nas soluções de referência, sendo elas as recém preparadas e aquelas a serem descartadas.

Chegado o oitavo dia, ou quando 60% ou mais das fêmeas adultas do controle tiverem produzido no mínimo 15 organismos jovens, o ensaio termina. Com isso, inicia-se a análise dos seguintes dados: número total de organismos produzidos por fêmea adulta, excluindo-se organismos machos ou aqueles que morreram devido manipulação inadequada; comparação dos níveis de sobrevivência em cada concentração com o do controle, verificando a existência de diferença relevante e comparação do número de organismos jovens produzidos em cada concentração com o número médio obtido no controle, observando discrepâncias significativas.

Nos ensaios de sensibilidade, os efeitos observados são, basicamente, a sobrevivência e a reprodução dos organismos. Dessa forma, os resultados obtidos podem ser expressos em CENO (concentração de efeito não observável), CEO (concentração de efeito observável), VC (valor crônico), CI (concentração inibitória), tóxico e não-tóxico e efeito agudo. De acordo com a USEPA (1992, apud ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008) para a determinação de resultados de toxicidade aguda com maior precisão recomenda-se a utilização de CL50 e CE50, enquanto que para a toxicidade crônica, VC e CI50 ou CI25 são os valores considerados mais seguros.

RESULTADOS ESPERADOS

Com a implementação do cultivo, espera-se que os organismos nele contidos consigam sobreviver e manter boa reprodutibilidade em condições adequadas, citadas anteriormente, que evitem o estresse dos organismos e consequente aparecimento de espécimes machos. Para tanto, espera-se que a água apresente temperatura média entre 23°C e 27°C, bem como Dureza Total média entre 40mg CaCO₃ e 48mg CaCO₃/L e pH com variação na faixa de 7,0 a 7,6. Dessa forma, anseia-se que eles possuam condições ideais para a realização dos testes de sensibilidade.

Até o momento, tem-se no cultivo (Figura 1) uma média de temperatura de 24,1°C, com medição realizada de segunda à sexta. Além disso, o pH da água encontra-se em média de 7,0128 e a natalidade por aquário permanece favorável, uma vez que tem sido obtidos semanalmente no mínimo 240 filhotes por aquário matriz, os quais contêm 70 adultos cada, os demais organismos são descartados a fim de evitar superlotação e consequente prejuízo ao cultivo.

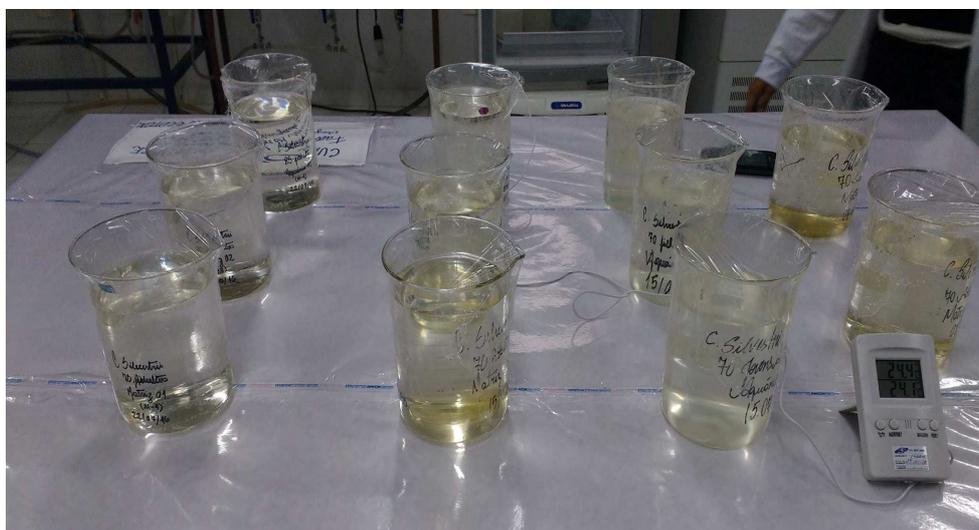


Figura 1: Cultivo de *Ceriodaphnia silvestrii*. Fonte: Autoras do Trabalho.

Quanto aos testes de sensibilidade a serem realizados, espera-se que apresentem mortalidade de organismos adultos inferior ou igual a 20% no controle, bem como que o número médio de organismos jovens produzidos por fêmea seja igual ou maior que 15, também no controle. Outrossim, almeja-se que os resultados obtidos possuam valor médio, desvio padrão e quociente de variação com variação na ordem de ± 2 . A partir desses dados objetiva-se elaborar uma carta controle do cultivo para que, assim, o mesmo possa ser aplicada a testes de qualidade de água e efluentes.

CONCLUSÃO

A água, recurso natural limitado, considerando que apenas 2,5% apresenta-se potável, é de extrema importância para a preservação da vida no planeta. No entanto, o homem parece não ter conhecimento disso, pois a degradação ambiental provocada pela intervenção antrópica no meio ambiente contribui para um agravamento no problema da qualidade desse recurso.

Dessa forma, para garantir a portabilidade da água, faz-se necessária a utilização de ferramentas que permitam a análise da qualidade desse recurso, além da conservação dos mananciais e dos ecossistemas neles contidos. Nessa perspectiva, a execução do projeto configura-se como o implante de mais uma ferramenta de estudo ecotoxicológico e análise de águas e efluentes no RN, principalmente no Instituto Federal do Rio Grande do Norte, auxiliando o desenvolvimento de atividades já existentes, bem como a inserção de outros estudos sobre gestão integrada de disposição e tratamento de efluentes tóxicos em ambientes aquáticos e seus efeitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - Referências - Elaboração. Ago. 2002. Disponível em: <http://www.usjt.br/arq.urb/arquivos/abntnabr6023.pdf>. Acesso em: 15 maio 2016.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: ecotoxicologia aquática – toxicologia crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia silvestrii* spp (Crustacea, Cladocera). 31 mar 2005.
3. BRASIL. Resolução CONAMA n° 357, de 19 de dezembro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dez. 1997. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res97/res23797.html>. Acesso: 11 maio 2016.
4. CESAR, A.; SILVA, S. L. R. da; SANTOS, A. R.. Testes de toxicidade aquática no controle da poluição, Santos-SP, 1997. Disponível em: <http://www.unisanta.br/arquivos/apostilaecotox.pdf>. Acesso: 29 abril 2016.
5. COELHO, K. **Estudos ecotoxicológicos com ênfase na avaliação da toxicidade de surfactantes aniônicos aos cladóceros *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2008. 146 f. Dissertação (Mestrado de Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/1938>. Acesso: 18 set 2016.
6. JACONETTI, P.C.M. **Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones - *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2005. 206 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Patricia%20Castilho%20Mamono%20Jaconetti_M.pdf. Acesso: 18 set 2016.
7. MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F.. **A ecotoxicologia como ferramenta de no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. *Oecol. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008. Disponível em: <file:///C:/Users/Nat%20C3%A1lia%20Rafaele/Downloads/DialnetAEcotoxicologiaComoFerramentaNoBiomonitoramentoDeE-2882847.pdf>. Acesso: 15 maio 2016.
8. MAIA, N.; MARTOS, H.; BARELLA, W.. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Bernardo do Campo, São Paulo: Educ, 2001. 285p.
9. MENDONÇA, J. M. S. **Avaliação da toxicidade de florações naturais e de cultura de cianobactérias: efeitos sobre *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera)**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/12502/1/JuskaMSM.pdf>. Acesso em: 18 set 2016.
10. Organization for Cooperation and Economic Development. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/>. Acesso: 15 de maio 2016.
11. RODRIGUES, N. **Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no Extrato solubilizado dos resíduos classe II A – não Inertes e classe II B – inertes**. 2005. 123p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v12n1/a02v12n1.pdf>. Acesso: 18 set 2016.
12. SILVA, D. V. R. da; PÔMPEO, M.; PAIVA, T. C. B. de. **A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil**. In: Pômpeo et al (Org.). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo – SP, CENTRO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; CENTRO DE BIOCÊNCIAS DA

- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2015. p. 340-353. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap._22_Ecotoxicologia.pdf. Acesso: 15 maio 2016.
13. TOMAZ, P.. Noções de ecotoxicologia. In: TOMAZ, P. (Org.). **Autodepuração dos cursos d'água**. 2008. p. 051-058. Disponível em: http://www.pliniotomaz.com.br/downloads/livros/livro_nitrogenio/capitulo05.pdf. Acesso: 15 maio 2016.
 14. ZAGATTO, P. A.. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.. (Org.) /Ecotoxicologia aquática/: Princípio e Aplicações. São Paulo: RiMa, 2008. p. 1-13.
 15. ZAGATTO, P. A.. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.. (Org.) **Ecotoxicologia aquática**: Princípio e Aplicações. São Paulo: RiMa, 2008. p. 185-197.