

## VI-197 - ESTUDO DE CASO DE TESTES ECOTOXICOLÓGICOS COM *CERIODAPHNIA DUBIA* NO RIO NEGRO

**Carlos Enrique de Medeiros Jerônimo<sup>(1)</sup>**

Engenheiro Químico (UFRN); Mestre e Doutor em Engenharia Química (UFRN); Professor da Universidade Potiguar.

**Marcelo Fidelis Marques Mendes<sup>(2)</sup>**

Biólogo (USP); Especialista em: Gestão Ambiental (CEUCLAR); Avaliação Ambiental (UNICAMP); Planejamento de Águas (UFAM).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Eng. Roberto Freire, 9036 – Ponta Negra – Natal - RN - CEP: 59090-000 – Brasil - e-mail: **c\_enrique@hotmail.com**

### RESUMO

Os testes de toxicidade são importantes para analisar o potencial de risco ambiental dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. Entretanto, deve-se atentar para que durante a escolha do organismo-teste as facilidades do uso de espécies padronizadas não sejam priorizadas em detrimento de bases científicas para a aplicação dos ensaios, como o significado ambiental à área de estudo. Este artigo discute sobre a possibilidade de ensaios de toxicidade realizados com *Ceriodaphnia dubia* fornecerem resultados pouco confiáveis para amostras de águas do rio Negro. Os resultados demonstram sua baixa aplicabilidade e necessidade de adaptação de métodos para esse fim.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ecotoxicologia, *Ceriodaphnia dubia*, rio Negro, análise biológica, recursos hídricos.

### INTRODUÇÃO

Durante grande parte da história da humanidade os recursos naturais eram considerados inesgotáveis e sua utilização realizada de maneira pouco parcimoniosa. Entretanto, essa exploração tornou-se realmente preocupante aos olhos do homem recentemente. O vertiginoso crescimento econômico e populacional decorrente da Revolução Industrial acelerou a insustentabilidade advindo do avanço da civilização e um dos recursos mais afetados com isso foi também um dos mais importantes à vida, a água (Villiers, 2002).

Essa relação predatória do homem para com os recursos hídricos elevou nas últimas décadas, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos de forma alarmante, comprometendo a saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas e a qualidade ambiental de maneira genérica (Marques et al., 2007).

Atividades antrópicas que se utilizam de recursos ambientais fornecidos pelos corpos d'água como transporte e diluição de resíduos lançadas no ambiente oriundas de diversas fontes de emissão (descarga de lixo domésticos e industriais, processos de drenagem agrícola e derrames acidentais de produtos perigosos) têm saturado o ambiente aquático com um grande número de substâncias tóxicas às quais a biota aquática está constantemente exposta (Tucci, 2004).

A percepção da contaminação dos sistemas aquáticos proporcionada por essa crise ambiental impulsionou o monitoramento da qualidade de água. Esta pode ser realizada essencialmente em dois níveis complementares entre si para uma efetiva caracterização. A qualificação mais difundida é proveniente das análises físico-químicas, responsáveis pela qualificação e quantificação das substâncias presentes na água. Já com aplicação em presente evolução estão as análises biológicas.

Este último tipo de análises supre algumas das lacunas deixadas pela anterior, que em muitos casos pode não ser capaz de detectar toxicidade oriunda da interação entre substâncias, dada a probabilidade de ocorrência de processos sinérgicos e antagônicos (Azevedo et al., 2003).

Inseridos nesta conjuntura temos os biotestes, biotox ou testes de ecotoxicidade, alternativas eficazes como fonte de diagnóstico da qualidade dos mananciais hídricos. Os testes de ecotoxicidade são exames, utilizados

com a finalidade de se estimar a toxicidade de substâncias, efluentes e amostras ambientais, realizados sob condições controladas em ambiente de laboratório. Durante estudos de ecotoxicidade, são quantificados os efeitos ocasionados às espécies-teste, por meio da exposição desses organismos às várias concentrações de uma ou mais substâncias, por período determinado (Azevedo et al., 2003).

Assim, os ensaios de toxicidade são ferramentas aplicáveis na avaliação da qualidade das águas ou a carga poluidora de determinado efluente, já que análises tradicionais de parâmetros físicos e químicos tais como concentrações de metais, de substâncias orgânicas ou inorgânicas, sólidos suspensos, demanda química de oxigênio (DQO) ou demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cujos limites estão instituídos em regulamentações legais, não são aptos a distinguir substâncias inertes no meio ambiente daquelas ocasionam risco ambiental e, comprometem efetivamente sistemas biológicos (Gherardi-Goldstein, 1988).

Com essa percepção o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) passou a exigir análises de toxicidade nos testes de padrões de lançamento de efluentes. O capítulo IV da Resolução número 357 de 2005 estabelece que o efluente não pode causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e que os critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados utilizando organismos aquáticos.

Com a finalidade de monitoramento do efeito causado por contaminantes em ecossistemas aquáticos em organismos, a ecotoxicologia aquática avalia fenômenos relacionados ao transporte, distribuição, transformação e destino final das substâncias tóxicas em sistemas hídricos, que são os principais receptáculos de rejeito com potencialidade tóxica, recebendo descargas feitas diretamente em suas águas, precipitação de emissões atmosféricas ou de depósitos no solo carregados por enxurradas (Azevedo et al., 2003).

No entanto, os testes de toxicidade não podem ser utilizados como substitutos dos ensaios químicos tradicionais, uma vez que esses não possibilitam obtenção de uma resposta absoluta sobre o risco que uma específica amostra ocasiona aos seres humanos. O fato advém da dificuldade de extrapolação dos resultados de toxicidade impetrados para os organismos em exames laboratoriais para humanos, visto que até mesmo a correlação de resultados de toxicidade entre espécies distintas obtidos é complexo e pouco confiável (Azevedo et al., 2003).

Além disso, deve-se considerar que, a princípio, devido às diversas condições abióticas e bióticas presentes nos ecossistemas aquáticos, não há nenhum organismo nem comunidade ecológica que possam ser usados para avaliar todos os efeitos possíveis sobre esses ecossistemas.

Azevedo et al. (2003) afirmam que, a princípio, qualquer espécie aquática é um potencial organismo-teste a ser aplicado nos testes de toxicidade. Porém, é fundamental que as espécies sejam biologicamente bem conhecidas e apresentem algumas propriedades especiais, são elas: seletividade constante e elevada aos contaminantes, elevadas disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, ampla distribuição e importância comercial, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório representatividade de seu nível trófico e significado ambiental em relação à área de estudo. Essa última condição é muito importante dada a diversidade e complexidade existente no ambiente aquático, que abrange rios, oceanos, lagos e estuários de heterogeneidade influenciada por interações entre seu meio biótico com clima, relevo e geologia específicos de sua localização.

O impacto de substâncias químicas no ecossistema aquático pode ser acentuado ou amenizado por propriedades intrínsecas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação, de sua carga contaminante no ambiente, além da constância e regularidade da descarga. Ademais, existem características qualitativas que conferem ao ecossistema resistência a choques provenientes da presença de substâncias exógenas, como a capacidade tamponante de seu meio aquoso e a concentração de compostos orgânicos nele dissolvidos.

Grande parte dessas características é atribuída ao ambiente foco do estudo deste artigo. O rio Negro é o mais importante afluente do norte do rio Amazonas, não só por banhar Manaus, o que lhe confere grande importância econômica, mas também pelo tamanho de sua bacia (com uma área de drenagem de 620 mil km<sup>2</sup> e descarga de 30 mil m<sup>3</sup>/s) e pelas peculiaridades que compõe seu meio biótico e abiótico (Lewis et al, 1995).

Segundo a classificação óptica, proposta por Wallace (1983), o rio Negro é um rio de águas negras, os quais são caracterizados por baixa concentração de sólidos inorgânicos dissolvidos e sólidos em suspensão (inferiores a 20mg/L, até dez vezes menos que rios de águas brancas da região), além de terem uma marcante coloração acastanhada escura, conferida pela dissolução de matéria orgânica em suas águas (Lewis et al., 1995).

O rio Negro tem seu pH (que varia de 3,6 a 5,8) afetado diretamente pela sua concentração de ácidos orgânicos. Esses ácidos têm um papel fundamental no balanço iônico nas águas pobres em nutrientes. A concentração de carbono orgânico dissolvido é de 9,0mg/L (bastante superior a rios de águas brancas que chegam a ter 3mg/L), efeito apontado à combinação de solo podzólico e extrema depleção de íons inorgânicos em associação à vegetação que habita a sua área de drenagem (Küchler. et al., 2000; Lewis, et al., 1995).

Essas propriedades químicas diferenciadas caracterizam às águas do rio Negro um natural desvio em relação a alguns parâmetros dispostos nas classificações de corpos d'água propostas pela Resolução CONAMA 357. É o caso, por exemplo, do pH, que para atendimento à legislação deve ser superior a 6,0 e inferior a 9,0.

Esse desenquadramento incide mesmo em áreas a montante de qualquer interferência antrópica significativa sobre as águas do rio Negro. É certo que tal ocorrência se dá pela normatização ter sido elaborada por instituições localizadas em áreas regidas por condições ambientais bastante distintas, sem a cautela em englobar exceções como é o caso do ambiente amazônico.

O mesmo vício sobrevém sobre os ensaios de ecotoxicidade. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) são os principais órgãos responsáveis pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade do Brasil. A utilização de testes padronizados é conveniente por favorecer a seleção de um ou mais testes uniformes e permitindo a comparação dos dados e facilitando a reprodução dos testes.

É o caso dos testes feitos com *Ceriodaphnia dubia*. Esses crustáceos de água doce da ordem Cladocera são um dos mais utilizados organismos em testes de toxicidade por sua importância na cadeia alimentar aquática. Ainda, oferecem facilidades técnicas como um ciclo de vida curto, relativas facilidades de cultivo em laboratórios, apresentam sensibilidade a vários contaminantes do ambiente aquático e possibilidade de produção de organismos geneticamente idênticos por facultarem de reprodução assexuada por partenogênese, o que garante a obtenção de organismos-teste com sensibilidade constante (Azevedo et al., 2003).

A *C. dubia* é comprovadamente um organismo-teste eficaz em testes para recursos hídricos de propriedades congruentes com a regulamentação CONAMA 357, contudo este artigo discute o seu emprego em águas regionais.

Destarte, esse trabalho buscou verificar a resposta a exames ecotoxicológicos padronizados (no caso com *C. dubia*) em grandes centros tecnológicos, baseados em suas respectivas condições ambientais predominantes, em águas de características químicas e biota distinta, como é o caso do rio Negro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados exames ecotoxicológicos em amostras de água coletadas em três pontos ao longo do rio Negro (RN1, RN2 e RN3) durante os meses de fevereiro, abril, junho, outubro e dezembro de 2009. No mês de outubro o teste abordou amostras de água de esgoto sanitário, um poço artesiano (PA) e um ponto localizado nas águas do rio Solimões (RS). Os locais de coleta estão inseridos no mapa representado pela Figura 1.



**Figura 1: Pontos de coleta das amostras.**

Os ensaios foram realizados segundo a padronização ditada pela norma ABNT NBR 13373 de 2005 e visa estabelecer a toxicidade crônica fundamentado nos efeitos sobre a sobrevivência e reprodução de *Ceriodaphnia dubia* por uma exposição durante um período de 7 dias. Os resultados são obtidos através da estimativa da concentração mais elevada da amostra que não causa efeitos deletérios aos organismos (concentração de efeito não observado ou CENO) e da concentração mais baixa que causa efeitos (concentração de efeito observado ou CEO) ou através da determinação da presença ou ausência de toxicidade, no caso de amostras testadas in natura.

As condições de realizações dos ensaios foram as seguintes:

- Organismo teste: jovens de *Ceriodaphnia dubia* com idade entre 6 e 24 horas;
- Temperatura média da água:  $24,6 \pm 0,5$  °C;
- Água de diluição e controle: água natural;
- Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro;
- Renovação do meio: cada 48 horas;
- Número de organismos por concentração: 10;
- Número de réplicas por concentração: 10;

O teste foi prorrogado em um dia para obtenção do mínimo de 15 jovens / fêmea no Controle. Os valores obtidos apresentam-se dentro dos critérios aceitos para a validação do teste.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos nos exames com as soluções-teste indicam toxicidade crônica do meio aquático. Conforme as Tabelas 1 e 2 a exposição do crustáceo *C. dubia* apresentou respostas estatisticamente diferentes do obtido no grupo controle nas taxas de reprodução ou sobrevivência. Para os resultados apresentados nas tabelas apresentaram-se os dados de amostras em uma concentração de 100%, ou seja, sem nenhuma diluição.

**Tabela 1: Resultados de ensaios de ecotoxicidade crônica em teste de mortalidade (valores dados em porcentagem).**

		fev-09	abr-09	jun-09	out-09	dez-09
<b>Rio Negro 1</b>	controle	0	0	0	0	0
	amostra (100%)	100	100	100	30	100
<b>Rio Negro 2</b>	controle	0	0	0	0	0
	amostra (100%)	100	100	0	60	80
<b>Rio Negro 3</b>	controle	0	0	0	0	0
	amostra (100%)	100	100	20	100	0
<b>Esgoto Sanitário</b>	controle	-	-	-	0	-
	amostra (100%)	-	-	-	100	-
<b>Rio Solimões</b>	controle	-	-	-	0	-
	amostra (100%)	-	-	-	20	-
<b>Poço Artesiano</b>	controle	-	-	-	0	-
	amostra (100%)	-	-	-	0	-

**Tabela 2: Resultados de ensaios de ecotoxicidade crônica em teste de fertilidade (valores dados da razão de jovens por adulto).**

		fev-09	abr-09	jun-09	out-09	dez-09
<b>Rio Negro 1</b>	controle	18	15	17	17	31
	amostra (100%)	1	0	0	3	0
<b>Rio Negro 2</b>	controle	18	15	17	17	31
	amostra (100%)	1	0	3	1	0
<b>Rio Negro 3</b>	controle	18	15	17	17	31
	amostra (100%)	0	0	2	0	7
<b>Esgoto Sanitário</b>	controle	-	-	-	16	-
	amostra (100%)	-	-	-	0	-
<b>Rio Solimões</b>	controle	-	-	-	16	-
	amostra (100%)	-	-	-	11	-
<b>Poço Artesiano</b>	controle	-	-	-	16	-
	amostra (100%)	-	-	-	4	-

Nota-se que algumas amostras revelaram, em algum percentual, organismos sobreviventes ao teste de mortalidade (Tabela 1), contudo, todos estes, durante o teste de reprodução (Tabela 2), evidenciaram, segundo a padronização dos ensaios, toxicidade crônica, diferenças estatísticas em relação às respostas apresentadas pelo grupo controle. Esse é o caso dos experimentos realizados nos pontos fora do rio Negro e considerados isentos de contaminação por meio de ação antrópica (rio Solimões e poço artesiano). Isso sugere que apesar da legislação demandar testes padronizados, esses podem ser inviáveis para determinados ambientes.

Tanto a atividade biológica como o impacto causado por agentes contaminantes no meio aquático podem ser comprometidos ou abrandados pelas características físico-químicas de determinado ecossistemas aquáticos. Assim, o exame de ecotoxicidade padronização com *C. dubia* pode não ser ideal para o ambiente do rio Negro e até mesmo do restante da bacia Amazônica (conforme indicam os testes em RS e PA). Azevedo (2003) adverte que a escolha de espécies representativas na área de estudo é um dos mais importantes fatores na escolha do organismo-teste.

Análises físico-químicas também foram realizadas com as amostras do rio Negro que passaram por exames ecotoxicológicos, a Tabela 3 refere-se apenas às médias de concentração dos parâmetros que em alguma das amostras pelo menos ultrapassou o limite CONAMA 357 para a classe enquadrada do curso d'água.

**Tabela 3: Médias das análises físico-químicas realizadas nas amostras do rio Negro e coluna com o limite de concentração estabelecido pela regulamentação.**

	Rio Negro 1	Rio Negro 2	Rio Negro 3	CONAMA 357 - classe 2
Alumínio Solúvel (mg Al/L)	0,12*	0,10*	0,09	0,1
Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)	3300*	1890*	1689*	1000
Fósforo Total mg P/L	0,05†	0,03	0,06*	0,05
pH - água	6,138	5,970*	5,723*	6,0 - 9,0
Cloro Residual Total (%Cl)	0,06*	0,02*	0,06*	0,01
Cor verdadeira (uH)	112*	110*	112*	75
Ferro Solúvel (mg Fe/L)	0,30*	0,28†	0,29†	0,3
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,5†	5,6†	6,0†	5

\*média fora dos patamares estabelecidos pela CONAMA 357.

†média dentro do limite estabelecido, mas alguma das amostras não se restringiu ao padrão determinado.

Nota-se que somente poucos são os parâmetros problemáticos em relação à extensa lista de proposta pela legislação pertinente (a CONAMA 357 lista aproximadamente 100 parâmetros a serem monitorados), sendo que destes destacam-se aqui o pH, a cor verdadeira, cloro residual total e coliformes termotolerantes. Apenas o último dos referidos indica ação antrópica, apesar dos mesmos testes revelarem uma DBO baixa nas amostras (com média inferior a 2mg O<sub>2</sub>/L). O resultado indica provável contaminação do recurso hídrico por esgoto sanitário.

Porém, apesar das três médias excederem o padrão, os dados brutos apontam que apenas as amostras dos meses de outubro e dezembro estavam fora do padrão CONAMA, de forma que a toxicidade crônica apontada no ensaio de ecotoxicidade pelas amostras dos meses anteriores não pode ser atribuída à contaminação sanitária apresentada pelo indicador coliforme termotolerante.

Especula-se que a toxicidade constatada pode ser ainda produto do pH do rio Negro, já que este é um parâmetro que durante todos os meses, e em quase todas as amostras apresentou-se fora do padrão CONAMA 357. Outra evidência é que a água de cultivo com a qual os organismos-teste são cultivados e à qual o grupo controle é exposto permanece sempre com seu pH entre 7,0 e 7,6, valores completamente discrepantes dos que ocorrem rio Negro, ambiente na qual a toxicidade está sendo testada. Além desta, muitas outras diferenças físico-químicas devem ocorrer entre a água de cultivo e a proveniente do rio Negro além da aqui levantada.

Outro ponto a ser considerado é que, apesar da forte descarga de contaminantes realizada em pontos próximos ao RN1 e RN2, processos de transporte e transferência de fase e processos de transformação, facilitados no rio Negro por sua alta vazão, influência de substâncias húmicas e pH possivelmente já contribuiriam para certa depuração no ponto RN3, e melhores resultados nos testes de ecotoxicidade poderiam ser constatados, caso apropriado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O simples resultado de toxicidade gera incerteza quanto aos constituintes da amostra que o provoca. Com a finalidade de identificar os contaminantes responsáveis pela toxicidade de corpos d'água, métodos conhecidos como TIE (*Toxicity Identification Evaluation*) podem ser utilizados como parte complementar dos protocolos de toxicidade. Esse método busca isolar uma ou mais substâncias e/ou classe de substâncias responsáveis pela toxicidade total de uma amostra através de manipulações, ajustes e tratamento, combinando a quantificação da toxicidade e inspeção isolada por técnicas analíticas dos contaminantes.

Postas as dúvidas a respeito da contaminação das amostras, a identificação de substâncias tóxicas ao organismo-teste é um passo essencial para compreensão do efeito das águas em análise, se realmente a toxicidade é fruto de ação antrópica ou de propriedades naturais das águas regionais e, consequente inaptidão do organismo-teste ao ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 13373. Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica - método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro RJ. ABNT. 2005.
2. AZEVEDO, F.A., CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Rima. 2003. São Carlos SP, 2003.
3. BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução No 357, de 17 de março de 2005: 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, e dá outras providências, Gráfica e Editora Itamarati, Brasília DF, 2005.
4. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Avaliação de toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia dubia*, Richard 1894 (Cladocera, Crustacea). CETESB, São Paulo SP, 1991.
5. GHERARDI-GOLDSTEIN, E. Testes de toxicidade de efluentes industriais. Ambiente, Vol. 2, No. 1, 1988.
6. KÜCHLER, I.L., MIEKELEY, N., FORSBERG, B.R. A contribution to the chemical characterization of rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 11, No. 3, 2000.
7. LEWIS, W.M.JR., HAMILTON, S.K., SAUNDERS, J.F.III. Rivers of Northern South America. Ed. Cushings, C., Cummins, K., Minshall, G.W., River and Stream Ecosystems, University of California Press, Berkeley, California, 1995.
8. MARQUES, M.N.; COTRIM, M.B.; PIRES, M.A.F. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Química Nova, São Paulo, Vol. 30, No. 5, 2007.
9. TUCCI, C.E.M. Desenvolvimento dos recursos hídricos no Brasil. Global Water Partnership, Brazil, 2004.
10. VILLIERS, M. Água: como o uso desse precioso recurso natural poderá acarretar a mais séria crise do século XXI. Ediouro, Rio de Janeiro RJ, 2002.